DIE UNTERDRÜCKUNG DER TRANSPLANTAT-GEGEN-WIRT REAKTION GEMESSEN IM LYMPHKNOTENTEST

Hans-Wolfgang König

1979

AUS DEM INSTITUT FÜR HÄMATOLOGIE
DER GESELLSCHAFT FÜR STRAHLEN- UND UMWELTFORSCHUNG
NEUHERBERG
INSTITUTSVORSTAND: PROF. DR. S.THIERFELDER

DIE UNTERDRÜCKUNG DER TRANSPLANTAT-GEGEN-WIRT REAKTION GEMESSEN IM LYMPHKNOTENTEST

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hans-Wolfgang König
aus Leipzig

München 1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. S. Thierfelder
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. W. Wilmanns
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 8.2.1979

UNIV. LEIDEN BIBL.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
EINLEITUNG	3
MATERIAL UND METHODEN	9
1. Verwendete Tiere	9
2. Seren	9
3. Empfängervorbehandlung	12
4. Spenderzellpräparation	13
5. Spenderzellvorbehandlung	14
6. Durchführung des Lymphknotentests	14
7. Versuchsauswertung	15
8. Markierung mit H^3-Thymidin	16
9. Statistische Auswertung	16
ERGEBNISSE	17
I. Stimulation durch Medium und syngene Zellen	18
II. Abhängigkeit vom Empfängertieralter	19
III. Dosis- und Volumenabhängigkeit	20
IV. Zeitlicher Verlauf der gvh	21
V. Reproduzierbarkeit	22
VI. Markierung mit H^3-Thymidin	24
VII. Transplantation im H-2 inkompatiblen System	25
1. CBL/CBA ohne Immunsuppr. + CBL	
2. CBL/CBA mit Immunsuppr. + CBL	
3. CBA " " + CBL	

Seite

VIII. Transplantation im H-2 kompatiblen System 29

1. CBA + AKR

2. AKR + C_3H

IX. Transplantation im xenogenen System 31

Lewis-Ratten + CBA

DISKUSSION 33

1. Immungenetik 33

2. Spenderzellen 38

3. Mechanismus der Lymphknotenvergrößerung 42

4. Immunsuppression 45

5. Eigene Ergebnisse 46

ZUSAMMENFASSUNG 50

LITERATURVERZEICHNIS 51

Einleitung

Ein grundlegendes Ziel immunologischer Untersuchungen der letzten Jahrzehnte war es, die Mechanismen der Transplantatabstoßung so detailliert zu erfassen, daß das Transplantationsergebnis voraussagbar und manipulierbar wird. Der Antrieb zu einer Fülle aufwendiger Untersuchungen lag in der enormen klinischen Bedeutung dieser Versuche. So erhoffte man sich nicht nur Fortschritte beim Ersatz menschlicher Organe, sondern auch weitere Aufschlüsse über Pathogenese, Diagnose und Therapie einer Reihe interner Erkrankungen mit Schwerpunkt auf den malignen Entartungen des hämato- und lymphopoetischen Systems.

Obgleich immunologische Versuche schon seit Anfang dieses Jahrhunderts in Form von Haut- und Tumortransplantationen durchgeführt wurden, blieben Ursachen und Mechanismus der Abstoßung lange Zeit im Dunkel. Ein entscheidender Schritt konnte erst in der Mitte der Vierziger Jahre durch die Arbeiten von Snell gemacht werden, der als Erster systematisch weitgehend reine Mäuseinzuchtstämme anlegte. Von besonderem Wert waren dabei die sog. "congenic lines", d.h. stark ingezüchtete Mäusestämme, die sich untereinander in möglichst nur einem Gen unterscheiden und damit dem Ideal einer Punktmutation möglichst nahekommen. Die dadurch erst möglichen gezielten genetischen Untersuchungen bei der Maus lenkten die Aufmerksamkeit auf das Problem der Histokompatibilität als entscheidendem Faktor für den Transplantationserfolg (85a).

Eine weitere wichtige Wende in Bezug auf Frage- und Problemstellung ergab sich einige Jahre später, als die Knochenmarkstransplantation in den Mittelpunkt des Interesses trat. Bei den bis dahin üblichen Organtransplantationen stieß regelmäßig der Empfänger das Transplantat ab. Das

Phänomen der "Sekundärkrankheit" nach Knochenmarkstransplantationen, aber auch histologische Befunde an transplantierten Hundenieren ließen erstmals vermuten, daß auch Zellen des Transplantates gegen den Empfänger reagieren können (39,133). Diese Auffasung wurde durch Versuche von Simonsen (131,134) und Billingham (18,19,20) bestätigt. Unabhängig voneinander stellten beide fest, daß die intravenöse Injektion von lymphatischen Zellen erwachsener allogener Tiere in neugeborenen und damit immunologisch wherlosen Tieren ein tödlich verlaufendes Syndrom verursachte. Nach einer Latenz von einigen Tagen bis zu zwei Wochen traten folgende charakteristischen Symptome auf: Diarrhoe, Wachstumsstillstand, Gewichtsverlust, Anämie, Haarausfall und ein obligat tödliches Ende (18,132). Histopathologisch entsprach dem ein zweiphasiger Verlauf: Zunächst Verschwinden der normalen Lymphozyten aus den peripheren lymphatischen Organen und ersatzweises Auftreten von großen pyroninophilen Zellen und anschließend zunehmende Atrophie und Fibrosierung von Milz und Lymphknoten. Billingham, der dies Syndrom als "runt disease" bezeichnet hatte, konnte weitere Hinweise dafür erbringen, daß nicht eine Infektion sondern die Zellen des Spenders für diese Krankheit verantwortlich sind (17). Diese Zellen, die dadurch charakterisiert waren, daß sie fremde Histokompatibilitätsantigene erkennen können und für die Transplantatabstoßung sowie die Transplantat-gegen-Wirt Reaktion (= gvh) verantwortlich sind, nannte man immunkompetente Zellen oder auch H-ARC (histocomp.-antigen-reactive-cell).
Die Sekundärkrankheit nach Knochenmarkstransplantation stellte sich damit nicht als "zweite Strahlenkrankheit" heraus, sondern als Wirkung einer bestimmten Spenderzellgruppe. Dies eröffnete die Möglichkeit, die protektive Wirkung der Knochenmarksstammzellen von ihrer destruktiven Wirkung in letal bestrahlten Tieren zu trennen, d.h. unter Erhaltung der Hämatopoese die sich entwickelnde gvh zu unterdrücken.

Zu diesem Zweck bildeten die umfangreichen Untersuchungen zwei Schwerpunkte:
1. Zur Vermeidung größerer Histokompatibilitätsunterschiede möglichst genaue Bestimmung des Gewebsantigenmusters ("typing")
2. Selektive Unterdrückung der immunkompetenten Zellen, so daß neben der Hämatopoese ein möglichst großer Teil der Lymphopoese funktionstüchtig bleibt. Dies schien vorallem dadurch notwendig, da schon die serologisch entdeckbaren Histokompatibilitätsloci einen solch ausgeprägten Polymorphismus aufwiesen, daß man nicht erwarten konnte, regelmäßig identische Spender-Empfängerkombinationen zu finden.

Im Rahmen dieser Untersuchungen erlangte die gvh zweierlei Bedeutung. Einmal war sie selbst Gegenstand der Untersuchung mit dem Ziel, das komplexe Syndrom von allem Unspezifischen zu trennen und die reine Spenderzellwirkung zu erfassen. Zum anderen stellte sie für die zu untersuchenden Zellen in Bezug auf deren Vorbehandlung und deren Wirkungsmechanismus ein geeignetes Testsystem dar.
Es sind etliche Tests entwickelt worden, von denen jedoch nur einige allgemeinere Bedeutung erlangten.
Zunächst wurde als Anhalt für die Beurteilung der Schwere einer gvh der Gewichtsverlauf und die Mortalitätsrate herangezogen (18-20,56,119). Diese Parameter lassen sich zwar nur schwer quantifizieren; es muß jedoch betont werden, daß sie unmittelbare Kriterien für die Spenderzellwirkung und damit für das Schicksal der Tiere darstellen im Gegensatz zu allen anderen Tests. Diese haben wiederum gemeinsam, ein betsimmtes Phänomen des Syndroms herauszugreifen und die Versuchsbedingungen so zu standardisieren, daß man die Spenderzellwirkung besser quantitativ erfassen kann.
So maß Howard in seinem "carbon clearance test" die gesteigerte Phagozytosefähigkeit des RES während einer gvh (77,78); Blomgren quantifizierte die Unterdrückung der

Erythropoese, d.h. die Anämie mittels Messung des Fe^{59}-Einbaus (21), Miller (99) und Bain (14) untersuchten das Ausmaß der periportalen Infiltrate der Leber; die größte Bedeutung erlangte wohl der "discriminant spleen assay" und der Splenomegalietest von Simonsen (131,132). Er konnte einen engen quantitativen Zusammenhang nachweisen zwischen dem sog. Milzindex und der Menge bzw. der antigenen Differenz der injzierten Zellen.
Der Nachteil dieser Tests bestand darin, daß durch intravenöse Applikation der Zellen eine generalisierte gvh hervorgerufen werden mußte, wodurch sich ein unkontrollierbar großer Einfluß des Empfängerorganismuß ergab mit entsprechend großer Streuung der Ergebnisse.
Als Alternative wurden Tests entwickelt, bei denen nur noch eine lokale gvh ausgelöst wurde. So wurde z.B. das Erythem nach intracutaner Injektion quantitativ ausgewertet (28,58), Wheeler transplantierte Milzscheibchen auf Nieren (151), Elkins applizierte Zellen lokal unter die Nierenkapsel von Ratten und wertete neben der Histologie das Nierengewicht im Vergleich zur unbehandelten Gegenseite aus (48,49). Eine Sonderstellung nehmen hier der CAM-Test (chorioallantoic membrane) (27,30,87) und die in vitro Tests ein, von denen die MLC und die CML (cell-mediated lymphocytotoxicity) die Wichtigsten sind. Diese Tests gestatten es, die Spenderzellproliferation bzw. die Entwicklung zytotoxischer Lymphozyten direkt zu messen. Sie haben wesentliche Erkenntnisse über die Reaktionsformen einzelner Zellarten beigetragen. Inwieweit man dies jedoch auf das Gesamtgeschehen der gvh übertragen darf, bleibt vorallem bei den in vitro Tests fraglich (80,88).
Die Entdeckung Levine's (86), daß die subkutane Injektion allogener Zellen in die Rattenfußsohle den regionalen Lymphknoten vergrößert, war schließlich Anlaß zu einer vielversprechenden Weiterentwicklung der gvh-Tests.

Ford griff diese Ergebnisse auf und zeigte in einem standardisierten Test an der Ratte, daß die Vergrößerung des regionalen Lymphknotens ein empfindliches, zuverlässiges und gut quantifizierbares Maß für die immunologische Spenderzellaktivität ist (57). Hardt (73), Emeson (52,53) und andere Autoren (74,75,153) erzielten ähnliche Ergebnisse bei der Maus.

Im Hinblick auf eine gezielte und suffiziente Immunsuppression sind die verschiedensten Zytostatika, Antiseren und Röntgenbestrahlung jeweils einzeln und in Kombination getestet worden. Dabei können die Spenderzellen im Rahmen der gvh-Versuche noch im Spendertier, nach der Präparation in vitro oder nach der Transplantation im Empfänger beeinflußt werde. Nach bisherigen Ergebnissen scheint die in vitro Behandlung in Bezug auf die klinische Anwendung am brauchbarsten zu sein (137).
Nachdem die Anwendungsmöglichkeiten der Zytostatika allein oder in Kombination mit der Bestrahlung durch die generell hohe Toxizität limitiert ist, haben die Antiseren an Bedeutung gewonnen. So stellte Gray (67) ein ALS her, das nicht nur eine starke Lymphopenie verursachte, sondern auch die Überlebenszeit eines Hautallotransplantates wesentlich verlängerte. Jedoch erst die Kombination mit der Bestrahlung zeigte ausreichende immunsuppressive Wirkung, um nach Knochenmarkstransplantation Langzeitchimären zu erhalten (13).
Als Spenderzellbehandlung erwies sich diese Kombination als ungeeignet, da sie unspezifisch toxisch für alle hämatopoetischen Zellen ist (43,143).
Ein Fortschritt in Richtung erhöhter Selektivität stellte eine Entdeckung von Reif und Allen dar(124). Sie zeigten, daß die für die Vermittlung der zellulären Immunität zuständigen Zellen ein gemeinsames Antigen tragen (Thy-1= theta), das ebenfalls auf den Zellen des Mäusehirns zu finden ist. Dadurch wurde es möglich, in größerem

Maßstab ein heterologes ATS herzustellen. Die in diesem Rohserum noch enthaltenen kontaminierenden Antikörper lassen sich nach Rodt (117) durch Absorption an verschiedene Zellsuspensionen entfernen.
Ziel der vorliegenden Untersuchungenwar es, die Frage zu klären, inwieweit sich die immunsuppressive Wirkung des ATS in immungenetisch verschiedenen Systemen durch den Lymphknotentest bestätigen läßt. Weiterhin wurde der Einfluß verschiedener Parameter auf den Lymphknotentest untersucht, um die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der in diesem Versuchsablauf gewonnenen Ergebnisse zu prüfen.

Material und Methoden

1. Tiere

Als Empfänger wurden 8-12 Wochen alte Mäuse mit einem Gewicht von ca. 25 g verwendet. Kränkliche Tiere und solche mit Bißstellen wurden aussortiert. Um bei den z.T. sehr aggressiven Tieren Beißereien und die damit verbundenen lokalen Infekte zu vermeiden, wurden pro Käfig maximal 6 Tiere angesetzt. Die Tiere standen in einem auf 25°C klimatisierten Raum, wurden in Plastikkäfigen vom Typ Makrolon III gehalten und bekamen Altromin-Standardfutter. Das Alter der in einem Versuch verwendeten Spendertiere differierte maximal um eine Woche (siehe S.19).

Empfänger: Mäuse vom Stamm CBA, CBL/CBA, AKR

Spender: Mäuse vom Stamm CBA, C57BL/6, AKR, C_3H
Lewis-Ratten

Herkunft: Jackson-Laboratorium, Bar Habor, Maine (USA):
C57BL/6, CBA, CBL/CBA
Bomholtgaard, Ry (Dänemark): AKR
Gesellschaft f. Strahlen- und Umweltforschung
Neuherberg, München : C_3H, Lewis-Ratten
Die Kaninchen stammten von einem privaten Tierzüchter.

2. Seren

Zur Empfängerkonditionierung wurde in allen Versuchen ein heterologes Antilymphozytenglobulin (ALG) verwendet, das aus dem ungereinigten Antilymphozytenserum gewonnen wurde. Die Herstellung des ALS, erstmals von Gray beschrieben (67), erfolgte nach einem von Turk (141) abgewandelten Verfahren. Er verwendete zur Immunisierung statt Lymphknotenzellen Thymuszellen; das gewonnene Serum zeigte dadurch eine erhöhte Spezifität gegen die zellulär vermittelte Immunität.

a) Herstellung des ALS

Etwa 4-6 Monate alten Kaninchen wurden suspendierte Mäuse-Thymuszellen intravenös injziert. Die Boosterungen erfolgten am 21., 22., und 23. Tag nach der Erstimmunisierung. Dabei wurden jeweils $100x10^6$ Zellen appliziert. Am 28. Tag wurde jedem Tier etwa 100ml Blut aus einer Ohrvene entnommen und am 30. Tag wurden alle Tiere durch einen Carotiskatheter in Äthernarkose entblutet. Das Blut wurde mit 4000 U/min zentrifugiert und das gewonnene Serum mit Natriummerthiolat in einer Verdünnung von 1:10 000 haltbar gemacht. Das Serum von jeweils 8 Kaninchen wurde gepoolt und bei $-20^{\circ}C$ gelagert.

Zur Kontrolle der Toxizität wurden 4-6 Wochen alten CBL-Mäusen 0,25 ml einer kleinen gepoolten Menge intraperitoneal injziert. Starb innerhalb einer Woche ein Tier, wurden die Seren einzeln getestet. Nach Aussonderung der toxischen Charge wurden die übrigen gepoolt. Die Kontrolle der immunsuppressiven Wirkung erfolgte durch einen Transplantationsversuch. 10-12 Wochen alte CBL-Mäuse wurden 8 Tage lang mit jeweils 0,25 ml Serum intraperitoneal vorbehandelt. Am 9. Tag erhielten sie ein CBA-Hauttrans-Plantat, das ab dem 16. Tag im Abstand von 2 Tagen kontrolliert wurde. Wenn bei mindestens 50% der Tiere das Transplantat 16 Tage lang erhalten blieb, wurde das Serum als immunsuppressiv angesehen.

Herstellung des ALG

Die im ALS enthaltene Globulinfraktion wurde mit Ammoniumsulfat ausgefällt. der Bodensatz wurde in Phosphatpuffer bei pH 8 aufgelöst und zur restlosen Entfernung des Ammoniumsulfates in Phosphatpuffer dialysiert. Die erhaltene Globulinlösung wurde mittels Säulenchromatographie (DE-52 Säule mit Zellulosefüllung) weiter gereinigt und in einem Amicon-Ultrafilter auf eine Konzentration von 10 mg/ml eingeengt.

b) Herstellung des heterologen Antithetaserums (ATS)

Die Hirne von 12 CBA-Mäusen wurden möglichst blutfrei herauspräpariert und nach Zugabe der doppelten Menge isotoner Kochsalzlösung zu einer homogenen Masse gepottert. 0,75 ml dieser Suspension und 0,75 ml Freund'sches Adjuvans wurden innigst vermischt bis eine weiße, dickflüssige Masse entstand. Bei der Erstimmunisierung wurden 8 Kaninchen jeweils 1,5 ml dieser Masse an je drei Stellen (beide Hinterpfoten,Nacken) subcutan injziert. die Boosterungen erfolgten am 14., 15., 16., und 23. Tag ohne Freund'sches Adjuvans intravenös.
Am 28. Tag wurden jeweils 100 ml Blut aus einer Ohrvene entnommen und am 31. Tag ganz entblutet. Das Abseren erfolgte bei 4000 U/min, die Lagerung nach Zugabe von Na-Merthiolat bei -20°C.

Absorption

Die Absorption erfolgte mit NMRI-Leber und Balb-Plasmozytomzellen. Die präparierten Lebern bzw. Plasmozytome wurden mit etwa dem 10-fachen Volumen Kochsalzlösung gepottert. Nach Zentrifugation (15 min./ 3000 U) wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen erneut mit Kochsalz aufgeschwemmt und wieder zentrifugiert. Der Vorgang wurde mehrmals wiederholt bis der Überstand klar war. Es wurde zweimal mit Leber und einmal mit Plasmozytom absorbiert, indem die präparierten Zellen und das Rohserum jeweils im Gewichtsverhältnis 1:2 zusammen inkubiert wurden. Die Inkubation dauerte 30 min bei Zimmertemperatur und ebensolange bei 4°C. Das so erhaltene Serum wurde durch Ultrazentrifugation (Beckman 12, 40000 U/min) und sterile Filtration (Millipore 0,22) abschließend gereinigt.
Die Isolierung der IgG-Fraktion erfolgte wie unter 2.a beschrieben.

Zytotoxischer Test:

Die Kontrolle der zytotoxischen Wirkung des Serums erfolgte durch Testung in der KBR gegenüber Thymus- und Knochenmarkszellen. Während die Toxizität für Knochenmark bei einer Verdünnung von 1:2 bis 1:8 lag, lag sie für Thymuszellen bei einer Verdünnung von 1:64 bis 1:256.

c) Komplement

1. Narkotisierte Meerschweinchen wurden durch Punktion der Bauchaorta entblutet, das gewonnene Serum im Verhältnis 1:20 mit Difco-Agar vermischt und eine Stunde bei 4°C inkubiert. Nach Abzentrifugieren wurde die Aktivität im zytotoxischen Test geprüft, wobei eine Serumverdünnung von 1:100, nach Zugabe toxischer Antikörper, die Hammelerythrozyten zu 100% lysierte. Das Serum wurde portioniert bei -70°C gelagert.
2. Narkotisierte Ratten wurden durch Punktion des Herzens mittels einer dicken Kanüle weitgehend entblutet; das frisch gewonnene Serum wurde wie unter 1. verarbeitet und anschließend sofort im Versuch weiterverwendet. Auf eine zytotoxische Testung wurde verzichtet.

d) Medien
Zur Inkubation und Aufschwemmung der Zellen wurde durchwegs nur L-15 Leibovitz Medium verwendet.

3. Vorbehandlung der Empfänger

Um die Wirt-gegen-Transplantat Reaktion (hvg) zu unterdrücken, wurden die Empfänger einer kombinierten ALS/Bestrahlungsbehandlung unterzogen. Als optimal erwies sich hier das Schema von Rößler (118) : 3/3 ALG; 900r, d.h. jeder Maus wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 0,25 ml ALG intraperitoneal injziert; am 3.Tag

nach der letzten Injektion wurden die Tiere in einer Bestrahlungstrommel einer Cs^{137}-Strahlung ausgesetzt entsprechend einer Dosis von 900r (Siemens 7 KC, 16 min., Abstand 134 cm). Die Transplantation erfolgte noch am gleichen Tag.

4. Präparation der Spenderzellen

Den jeweiligen Spendertieren wurde die Milz sowie Hals-, Achsel-, Inguinal- und Mesenteriallymphknoten entnommen, wobei aus einer Milz ca. 100 Mill. und aus den Lymphknoten insgesamt etwa 60-100 Mill. Zellen gewonnen wurden. Die Organe wurden durch ein Plastiksieb in eine Petrischale gedrückt und mit Medium suspendiert. Die Suspension wurde durch eine dünne Injektionsnadel aufgesogen und durch ein Gazehütchen filtriert. Die gepoolten Zellen aller Milzen bzw. Lymphknoten wurden nun mit einer geeichten Pipette in vier, den jeweiligen Gruppen entsprechende Portionen aufgeteilt und in einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Um die z.T. erhebliche Kontamination mit Waschmittelrückständen und eventuelle Infektionen zu vermeiden, wurden soweit wie möglich sterile Einmalartikel verwendet. Da bei der Weiterbehandlung der Zellen sehr kleine Volumina mit hohen Zellkonzentrationen verarbeitet wurden, mußten außer den toten Zellen noch Verluste durch Zentrifugieren und Aufschwemmen berücksichtigt werden. In einer Versuchsserie wurde ermittelt, daß etwa 10-20% der ausgezählten Zellen in dem weiteren standardisierten Versuchsablauf verlorengehen. Die Zahl der lebensfähigen Zellen wurde durch den Trypanblautest ermittelt. Es ergab sich, daß in der unbehandelten Suspension im Mittel 5% (3-7%) tote Zellen vorhanden waren. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde generell eine Verlustquote von 20% eingerechnet, d.h. die frisch präparierten, filtrierten und in die Reagenzgläser verteilten Zellen wurden gezählt, die erhaltene Zellzahl um 2o% vermindert und dies Ergebnis

als Ausgangsbasis für die Berechnung des einzustellenden Volumens genommen. Als Kontrolle wurde in der Gruppe mit den unbehandelten Zellen die Zellzahl im endgültig eingestellten Volumen bestimmt. Die Abweichungen lagen maximal zwischen 18-21 Mill./30µl.

5. Vorbehandlung der Zellen

Die Versuche wurden für jede Spender-Empfängerkombination in vier Gruppen mit verschieden vorbehandelten Spenderzellen durchgeführt:

1. Gruppe: Homologe/heterologe Zellen
2. Gruppe: " " " + Antithetaserum (1:6)
3. Gruppe: " " " + Antithetaserum (1:6)
   + Komplement (1:4)
4. Gruppe: Syngene Zellen + Antithetaserum + Komplement

Alle Gruppen wurden grundsätzlich den gleichen Manipulationen unterzogen und unterschieden sich nur in der jeweiligen Zugabe von Serum bzw. Komplement bzw. Medium:

a) 15 min. zentrifugieren bei 1000 U/min.
b) Aufschwemmen mit Medium auf 1 ml und Zugabe von 0,2 ml Serum bzw. Medium
c) 30 min. Inkubation bei 37°C im Wasserbad
d) Zugabe von 0,4 ml Komplement bzw. Medium
e) 60 min. Inkubation bei 37°C im Wasserbad
f) Zentrifugieren und Einstellen auf gewünschte Zellzahl/30µl.

6. Durchführung des Lymphknotentests

Die vorbehandelten Tiere bekamen ca.0,3 ml einer 15%igen Evipanlösung intraperitoneal injziert. Die präparierte Zellsuspension wurde mit einer 100µl-Hamiltonspritze mit luer-

Ansatz aufgezogen und jedem Tier die erforderliche Zellzahl in 30µl in die rechte hintere Fußsohle injziert. Dabei wurde die Nadel subkutan von der Ferse bis in den Vorfußbereich geschoben und dort das Flüssigkeitsdepot gesetzt. Es trat praktisch kein Reflux ein.

Die Versuchsvariante anderer Autoren, nämlich vom Vorfuß zur Ferse zu stechen (140) oder hintereinander zwei kleinere Depots zu injzieren (53,118) haben sich im Hinblick auf die anzustrebende möglichst geringe Gewebstraumatisierung bei kleinem Reflux nicht bewährt.
Die kontralaterale Seite erhielt jeweils das gleiche Volumen L-15 Medium.

7. Auswertung des Lymphknotentests

Die Auswertung eines Versuches wurde am 5. Tag nach der Transplantation durchgeführt. Das Maximum der gvh liegt zwar am 7. Tag (Abb. 4), jedoch müßte man bei der Präparation am 7. Tag für einen relativ geringen Gewichtszuwachs des Lymphknotens eine beachtliche Zunahme der Streuung der Ergebnisse in Kauf nehmen.

Präparation der Lymphknoten

Die Mäuse wurden in einem Äthertopf getötet, auf ein Korkbrett gespannt und mit Hilfe einer Lupenbrille die Popliteallymphknoten beidseits herauspräpariert. Nach sorgfältigster Entfernung aller Bindegewebs- und Fettreste wurden die Lymphknoten getrennt in je ein mit 2ml Aceton gefülltes Reagenzglas gegeben. Am nächsten Tag wurde das Aceton abgegossen und die Lymphknoten noch ca. 6 Std. getrocknet. Die getrockneten Lymphknoten wurden auf einer Sartorius-Analysenwaage gewogen (Genauigkeit: $\pm$ 0,01 mg).

8. Markierung mit H_3-Thymidin

Die Tiere bekamen am 5. Tag nach der Transplantation 0,3 m Curie H_3-Thymidin intravenos injiziert. Drei Stunden später wurden die Tiere getötet, die Lymphknoten präpariert und in ein Gefäß gelegt, das mit einer auf pH 2 gepufferten Pepsinlösung gefüllt war. Nach 48 Std. Inkubation bei 37°C wurde eine Szintillationsflüssigkeit (50 mg POPOP, 30 mg PPO, 5 mg Toluol/100 ml) zugegeben und die Gefäße in einen Packard β-Zähler gestellt. Das Ergebnis wurde in counts per minute (cpm) gemessen und stellt ein Maß für die Zellproliferation im Lymphknoten dar.

9. Statistische Auswertung

Fast alle Versuche wurden mehrmals unter völlig gleichen Bedingungen durchgeführt. Als Maß für die Aktivität der Spenderzellen galt das Verhältnis der Lymphknotengewichte der behandelten zur unbehandelten Seite. Gleiche Versuche wurden gepoolt und daraus Mittelwert und Standardabweichung ermittelt. Die Signifikanz zwischen den jeweiligen Gruppen wurde mit Hilfe des T-Tests berechnet. Ergebnisse mit einem $p \leq 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

Ergebnisse

Nach Ford (57) haben nicht nur das injzierte Volumen und das Empfängertieralter, sondern auch die Technik der Injektion bei Durchführung von verschiedenen Personen einen gewissen Einfluß auf die Lymphknotenvergrößerung. Um die Aussagekräftigkeit der Ergebnisse besser beurteilen zu können, sollte im ersten Teil untersucht werden, wie sich bei der gewählten Versuchsanordnung verschiedene Parameter auf das Lymphknotengewicht auswirken. Dazu wurden folgende Versuche durchgeführt:

I. Stimulation durch Medium sowie syngene Zellen mit und ohne heterologem Serum
II. Abhängigkeit vom Empfängeralter
III. Dosis- und Volumenabhängigkeit
IV. Zeitlicher Verlauf der gvh
V. Reproduzierbarkeit
VI. Markierung mit H_3-Thymidin

Im zweiten Teil wurden Transplantationen mit dem Ziel durchgeführt, die Wirkung der reinen ATS- bzw. der kombinierten ATS/Komplementbehandlung der Spenderzellen auf die Lymphknotengröße zu untersuchen. Als Spenderorgane wurden auf Grund des unterschiedlichen T-Zellgehaltes Milz und Lymphknoten gewählt; transplantiert wurde im H-2 kompatiblen, H-2 inkompatiblen und xenogenen System mit folgenden Tierstämmen:

VII.	H-2 inkompatibel:	CBL/CBA	+	CBL-Milz bzw. Lymphkn.
		CBA	+	CBL- " "
VIII.	H-2 kompatibel:	CBA	+	AKR- " "
		AKR	+	C_3H- " "
IX.	Xenogen:	CBA	+	Lewisrattenmilz

I. Stimulation durch Medium und syngene Zellen (Abb. 1)

Mit Hilfe dieses Versuches sollte festgestellt werden, inwieweit die Lymphknotengewichte bei nicht transplantierten Tieren im Vergleich zur jeweils kontralateralen Seite schwanken und inwieweit schon die Injektion von Medium bzw. syngener Zellen zusammen mit heterologem Serum eine Stimulation bewirkt.
Es wurden folgende fünf Gruppen gebildet:

A) CBA	+	3/3 ALG 900r	+ keine Injektion
B) CBA	+	3/3 ALG 900r	+ 30 µl L-15 Medium
C) CBA	+	3/3 ALG 900r	+ 20×10^6 CBA-Milzzellen
D) CBL/CBA	+	3/3 ALG 900r	+ 20×10^6 CBL/CBA-Milzzellen mit ATS und Komplement
E) CBL/CBA	+	-	+ 20×10^6 CBL/CBA-Milzzellen mit ATS und Komplement

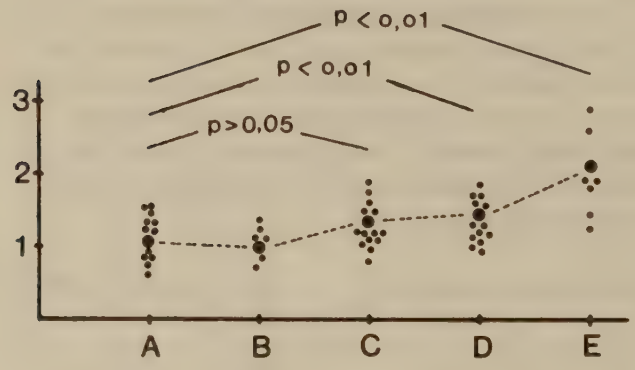

Abb. 1

In Gruppe A ergab sich, daß die Popliteallymphknoten bei nicht transplantierten Tieren unterschiedlich schwer sind. Die Abweichungen betragen maximal ± 50%, was einem Vergrößerungsfaktor von 1,5 bzw. 0,5 entspricht. Die Injektion von Medium (Gr. B) beeinflußt das Lymphknotengewicht überhaupt nicht, während die Injektion syngener Zellen, vorallem bei nicht vorbehandelten Empfängern (Gr. E), eine gerinfügige Stimulation bewirkt, die sich in Gr. D und E auch als statistisch signifikant erwies. Die heterologen Seren ATS und Komplement wirken sich auf das Lymphknotengewicht praktisch nicht aus (Vgl. Gr. C und D).

II. Abhängigkeit vom Alter der Empfängertiere (Abb. 2)

Nach Untersuchungen einiger Autoren ist der Empfängerorganismus an der Lymphknotenvergrößerung oder auch an der Splenomegalie im Verlaufe einer gvh in erheblichem Umfang beteiligt (25,26,47,50,102,103), wobei u.a. das Empfängertieralter einen wesentlichen Einfluß hat (132). In diesem Versuch soll geprüft werden, inwieweit dies für die bestrahlten und mit ALG vorbehandelten Empfänger noch zutrifft. Dazu wurden im schwachen und starken System folgende unterschiedlich alte Empfänger gewählt:

A)	CBA	(9 Wo. alt)	+ 3/3 ALG 900r	+ AKR-Milz
B)	CBA	(12 Wo. alt)	+ 3/3 ALG 900r	+ AKR-Milz
C)	CBL/CBA	(8 Wo. alt)	+ 3/3 ALG 900r	+ CBL-Milz
D)	CBL/CBA	(10 Wo. alt)	+ 3/3 ALG 900r	+ CBL-Milz

Abb.2 zeigt, daß selbst ein Altersunterschied von zwei Wochen ein signifikant anderes Lymphknotengewicht ergibt, in dem Sinne, daß die Reaktion bei den jüngeren Tieren erheblich stärker ist.

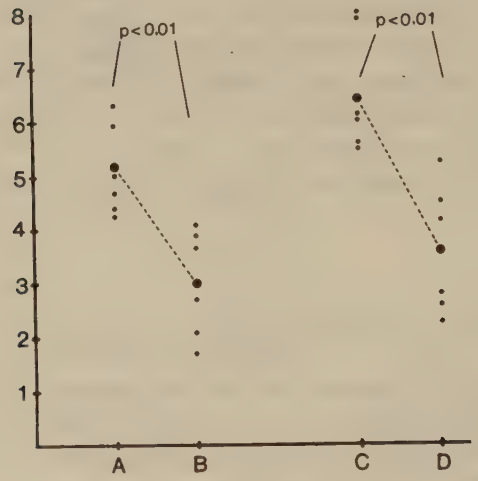

Abb. 2

III. Dosis- und Volumenabhängigkeit (Abb.3)

Als Empfänger dienten fünf Gruppen vorbehandelter CBA-Mäuse zu je sechs Tieren. Alle Tiere erhielten 30 µl einer unbehandelten CBL-Milzsuspension unterschiedlicher Zellkonzentration. Die Zelldosis betrug jeweils 10/15/20/25/30 x 10^6 in 30 µl.

Es ergab sich eine maximale Stimulation bei einer Zelldosis von 20 x 10^6 Zellen. Während sich eine Überschreitung dieses Wertes um 50 % auf das Lymphknotengewicht überhaupt nicht auswirkte, nahm bei Unterschreitung von 25 % das Lymphknotengewicht signifikant ab.

Eine sechste Gruppe erhielt 20 x 10^6 Zellen/Maus in einem Volumen von 20 µl. Entgegen den Befunden an der Ratte (57) wirkte sich hier die Volumenänderung nicht auf das Lymphknotengewicht aus.

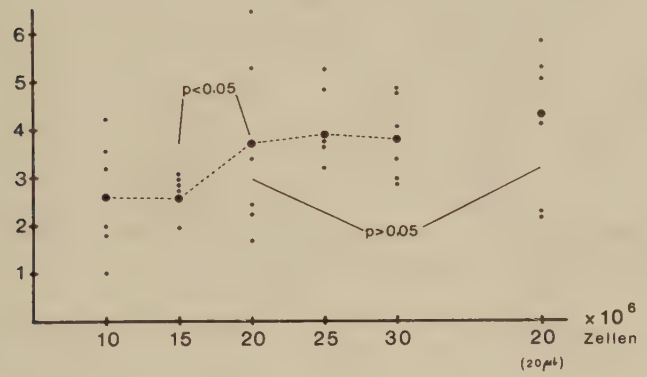

Abb. 3

IV. Zeitlicher Verlauf der gvh (Abb.4)

Vorbehandelten CBA-Mäusen wurden jeweils 20 x 10^6 CBL-Milzzellen injiziert. Die Lymphknotenpräparation fand am 3./5./7./10. und 12 Tag nach der Transplantation statt. Das Lymphknotengewicht war am 7. Tag am größten. Bei der Auswertung der Hauptversuche wurde jedoch am 5. Tag präpariert, da man für den Gewichtszuwachs bis zum 7. Tag eine unverhältnismässige Zunahme der Standardabweichung in Kauf nehmen müßte. Zudem beginnt sich ab dem 7. Tag die massive Empfängervorbehandlung in einer steigenden Mortalität auszuwirken.

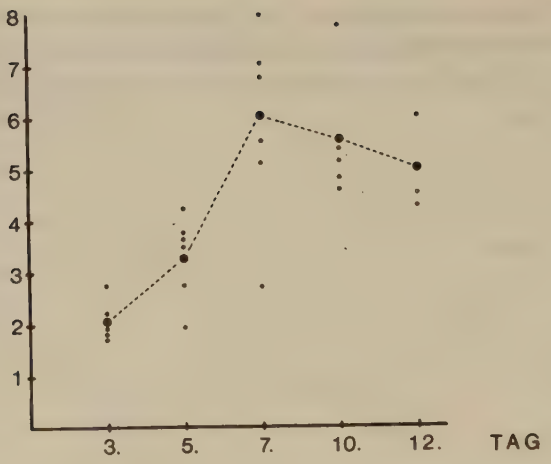

Abb. 4

V. Reproduzierbarkeit (Abb.5)

Die Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse wurde in drei verschiedenen Spender-/Empfangerkombinationen überprüft, indem eine Versuchsanordnung viermal an verschiedenen Tagen wiederholt wurde.

I.	CBA	+ 3/3 ALG 900r	+	CBL-Milz (Abb.5a)
II.	CBL/CBA	+ 3/3 ALG 900r	+	CBL-Milz + ATS + Kompl. (Abb.5b)
III.	CBA	+ 3/3 ALG 900r	+	Rattenmilz (Abb.5c)

Abb.5 zeigt, daß nur eine einzige Versuchswiederholung ein signifikant anderes Ergebnis erbrachte.

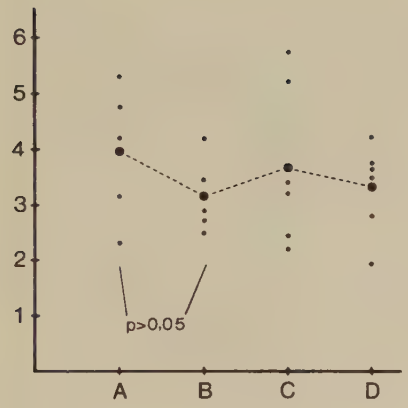

Abb. 5a

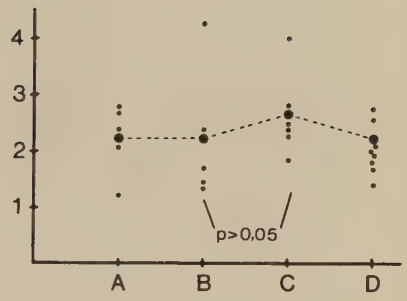

Abb. 5b

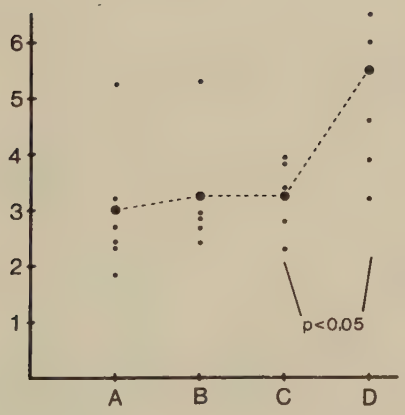

Abb. 5c

VI. Markierung mit H^3-Thymidin (Abb. 6)

Die Auswertung des Fußsohlentests erfordert eine diffizile Präparationstechnik. Um einen Anhalt für die Größenordnung von Präparationsfehlern zu erhalten, wurde eine Versuchsserie parallel einmal durch Lymphknotenwägung und einmal durch radioaktive Markierung ausgewertet. Da das den Lymphknoten umgebende Fett- und Bindegewebe nur sehr wenig proliferierende Zellen enthält, ist der radioaktive "background" gering und die Präparationstechnik daher unkritisch. Als Empfänger wurden vorbehandelte CBA-Mäuse verwendet, die wie folgt transplantiert wurden:

A)	CBA	+ 3/3 ALG 900r	+ CBL-Milz
B)	"	"	+ CBL-Milz + ATS + Komplement
C)	"	"	+ CBA-Milz + ATS + Komplement
D)	"	"	+ keine Zellen

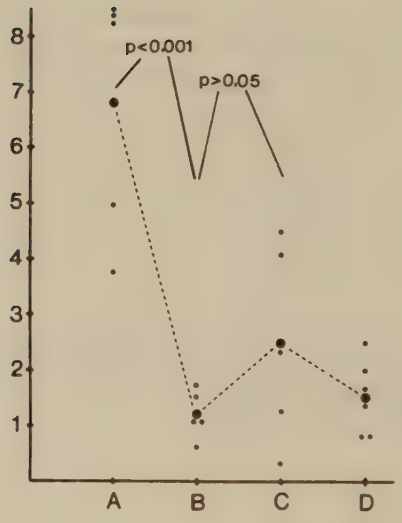

Abb. 6

Die Markierung ergab zwar einen absolut höheren Stimulierungsgrad und ist deshalb noch etwas empfindlicher als die Lymphknotenwägung. Die Ergebnisse sind jedoch in Bezug auf die Unterdrückung der gvn, Leerwerte und vor allem Streuung der Einzelwerte bei beiden Versuchen gleich. (Siehe auch Abb. 9a,b)
Man kann daher annehmen, daß die Standardabweichung vorwiegend auf eine unterschiedliche Zellproliferation zurückzuführen ist und nicht auf eine unsaubere Präparationstechnik.

Es muß dabei betont werden, daß die radioaktive Markierung zusätzliche Vorsichtsmaßnahmen verlangt und dadurch ein zusätzlicher nicht unerheblicher materieller Aufwand erforderlich ist. Diese Methode kann daher nicht, wie von Baines (31) vorgeschlagen, als Vereinfachung des Fußsohlentests angesehen werden.

VII. Transplantation im H-2 inkompatiblen System (Abb. 7-9)

Es wurden drei Versuchserien mit folgenden Untergruppen durchgeführt:

1. CBL/CBA + ohne Vorbehandlung + CBL-Milz (Abb. 7a)
   + CBL-Lymphkn. (Abb.7b)
   - A) Unbehandelte Spenderzellen
   - B) Spenderzellen + ATS
   - C) Syngene Zellen + ATS

2. CBL/CBA + 3/3 ALG 900r + CBL-Milz (Abb. 8a)
   + CBL-Lymphkn. (Abb. 8b)
   - A) Unbehandelte Spenderzellen
   - B) Spenderzellen + ATS
   - C) Spenderzellen + ATS + Komplement
   - D) Syngene Zellen + ATS + Komplement

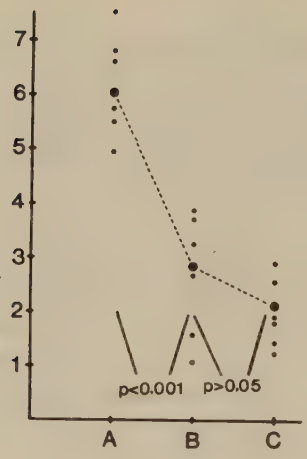

Abb. 7a

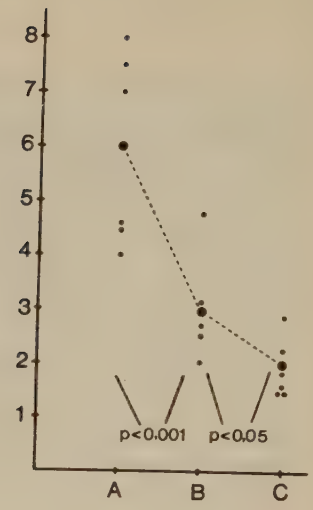

Abb. 7b

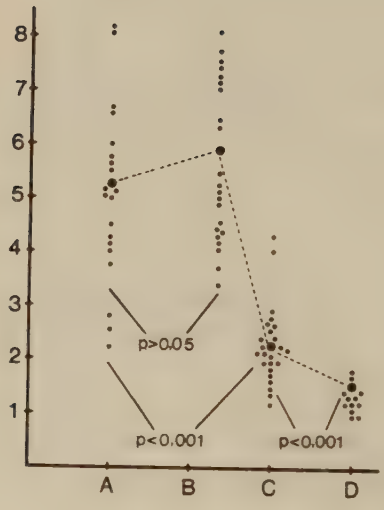

Abb. 8a

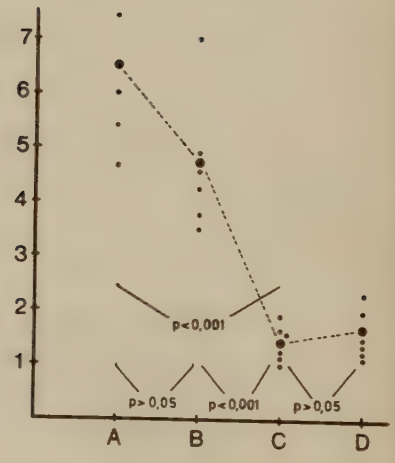

Abb. 8b

3. CBA + 3/3 ALG 900r + CBL-Milz (Abb. 9a)
+ CBL-Lymphkn. (Abb. 9b)

A) Unbehandelte Spenderzellen
B) Spenderzellen + ATS
C) Spenderzellen + Komplement
D) Spenderzellen + ATS + Komplement
E) Syngene Zellen + ATS + Komplement

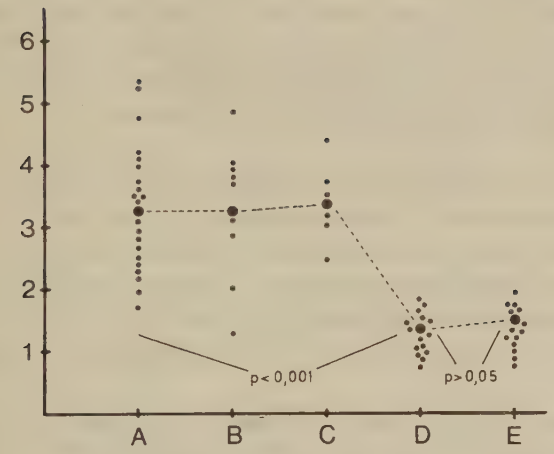

Abb. 9a

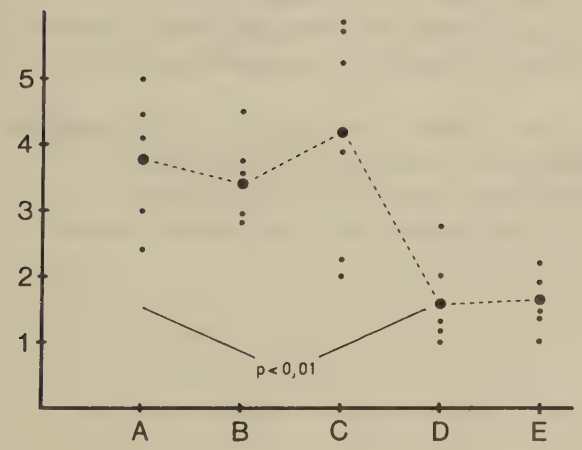

Abb. 9b

Die Injektion unbehandelter allogener Zellen verursacht mit (Abb. 8a,b) und ohne (Abb. 7a,b) Vorbehandlung in den F_1-Hybriden eine 5-6fache Stimulation. Ein Vergleich mit den absoluten Gewichten zeigt, daß durch die Vorbehandlung das absolute Lymphknotengewicht um über die Hälfte sinkt, das Verhältnis der behandelten zur unbehandelten Seite jedoch unbeeinflußt bleibt.
Die Stimulation bei den Parentaltieren ist nach den absoluten Gewichten gleich groß; bezogen auf den kotralateralen Lymphknoten beträgt die Stimulation jedoch nur das 3-4fache. Die Transplantation von Milz-bzw. Lymphknotenzellen zeigt im Hinblick auf die Stimulation keinen Unterschied.
Die Inkubation der Spenderzellen in reinem ATS zeigte nur bei den nicht immunsuppressiv vorbehandelten F_1-Hybriden eine signifikante Wirkung. Man muß hierbei jedoch in Betracht ziehen, daß das Mäusekomplement schwächer wirksam ist als das Meerschweinchenkomplement (68) und daß dadurch das ATS in vivo nicht seine volle Wirksamkeit entfalten kann.
Die Inkubation in ATS und Komplement vermindert dagegen in allen Versuchen signifikant die Spenderzellaktivität bis zur syngenen Kontrolle. Nur bei Transplantation von CBL-Milz auf CBL/CBA (Abb. 8a) ergab sich ein geringfügig, aber signifikant und reproduzierbar höheres Lymphknotengewicht im Vergleich zur syngenen Kontrolle.

Eine mögliche toxische Wirkung des heterologen Komplements wurde ausgeschlossen (Abb. 9a,b Gr.C). Da in allen Versuchen Komplement des gleichen Pools verwendet wurde, konnte auf eine weitere Testung des Komplements verzichtet werden.

VIII. Transplantation im H-2 kompatiblen System (Abb. 10,11)

Es wurde in zwei Spender/Empfängerkombinationen transplantiert:

1. CBA + 3/3 ALG 900r + AKR-Milz (Abb. 10a)
   + AKR-Lymphkn. (Abb. 10b)
2. AKR + 3/3 ALG 900r + C_3H-Milz (Abb. 11a)
   + C_3H-Lymphkn. (Abb. 11b)

A) Unbehandelte Spenderzellen
B) Spenderzellen + ATS
C) Spenderzellen + ATS + Komplement
D) Syngene Kontrolle

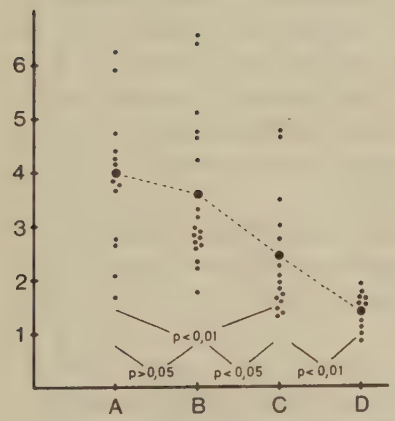

Abb. 10a

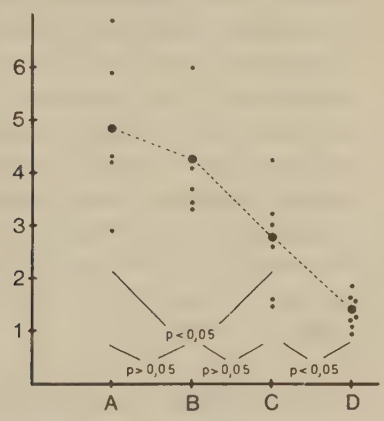

Abb. 10b

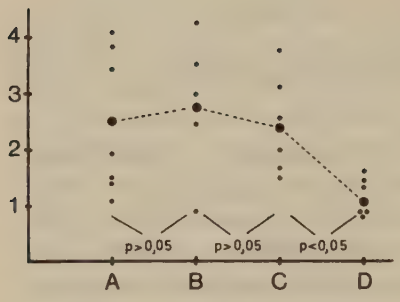

Abb. 11a

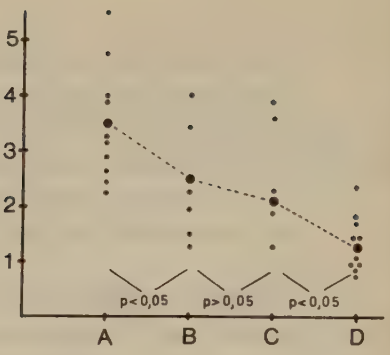

Abb. 11b

Bei beiden Versuchen ergab sich eine gut meßbare Stimulation, die bei der Kombination AKR auf CBA sogar in der Größenordnung des starken Systems lag, obwohl alle Stämme H-2 identisch sind ($H\text{-}2^k$). Inwieweit Differenzen bei den schwachen H-Loci bestehen, ist nicht bekannt. Befunde aus der MLC (84) lassen jedoch annehmen, daß die starke Stimulation durch die kumulative Wirkung mehrerer schwacher H-Loci zustande kommt.(siehe S. 35)
Entsprechend den Ergebnissen im starken System ergab die Inkubation in reinem ATS zwar verringerte Lymphknotengewichte, was sich statistisch jedoch als nicht signifikant erwies.
Die Behandlung sowohl der Milz- als auch der Lymphknotenzellen mit ATS und Komplement unterdrückte die Reaktion signifikant nur bei der Kombination AKR auf CBA, wobei die Werte der syngenen Kontrolle jedoch nicht erreicht wurden. Der verbleibende Unterschied erwies sich wiederholt als signifikant. Keinerlei Wirkung ergab sich für die Kombination C_3H auf AKR. Dabei fällt auf, daß je geringer die Stimulation ist, desto geringer ist die Wirkung der Inkubation in ATS bzw. ATS und Komplement.

IX. Transplantation im xenogenen System (Abb. 12)

CBA + 3/3 ALG 900r + Lewis-Rattenmilz

A) Unbehandelte Spenderzellen
B) Spenderzellen + ATS
C) Spenderzellen + ATS + Rattenkomplement
D) Spenderzellen + Ratten-ATS + Rattenkomplement
E) Syngene Kontrolle
F) Bestrahlte Spenderzellen (hvg-Kontrolle)

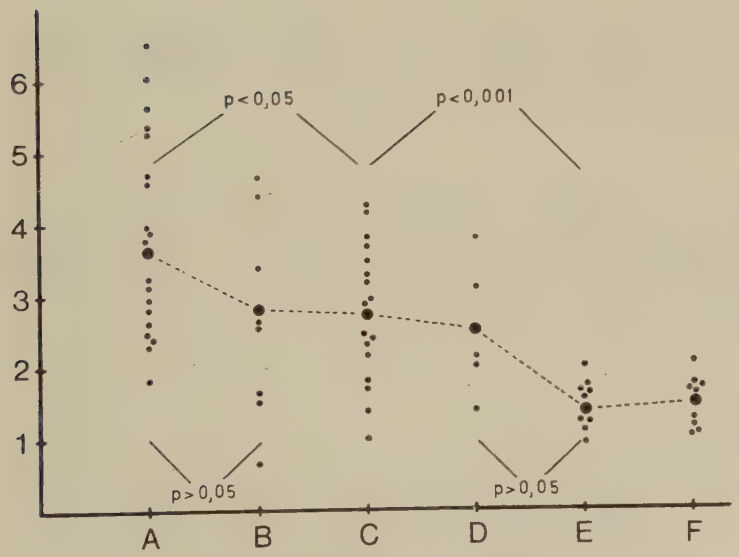

Abb. 12

Die Ergebnisse ähneln denen im schwachen System, d.h. ATS und Komplement vermindern signifikant das Lymphknotengewicht. Die Tatsache, daß die Inkubation in reinem ATS hier keine signifikante Wirkung zeigte, ist möglicherweise auf die geringe Tierzahl in diesem Versuch zurückzuführen und nicht auf die fehlende Wirkung des Serums.
Da die Lymphknotengewichte der mit ATS bzw. ATS und Komplement behandelten Gruppen noch hoch signifikant über denen der syngenen Kontrolle lagen, wurde in einem weiteren Versuch überprüft, ob ein Ratten-ATS eine stärkere Wirkung zeigt. das verfügbare Ratten-ATS war zwar nicht so spezifisch wie das Mäuse-ATS, da es nur mit Leber und nicht mit Rattenplasmozytom absorbiert werden konnte; es ergab sich jedoch auch hier keine stärkere Unterdrückung der gvh.

Um die Möglichkeit einer Stimulation durch das heterologe Komplement auszuschließen, wurde jeweils frisches Rattenkomplement verwendet.
Als Kontrolle für eine evtl. noch bestehende hvg wurden Rattenmilzzellen in vitro mit 2500r bestrahlt, wodurch die Zellen unter Erhaltung der Gewebsantigene sicher abgetötet wurden. Die Transplantation zeigte keinerlei Unterschied zur syngenen Kontrolle und bestätigte damit die suffiziente Immunsuppression des Empfängers.

Diskussion

Die Reduktion des komplexen Geschehens einer Sekundärkrankheit auf ein Teilphänomen wie die Proliferationsphase hat zwar eine Reihe geeigneter Testmodelle hervorgebracht; es bleibt jedoch problematisch, inwieweit die in ihnen gewonnenen Erkenntnisse Gültigkeit für das Gesamtgeschehen haben. Neben der Feststellung eines weitgehend analogen Verhaltens in Bezug auf Art der beteiligten Zellen, dem zeitlichen Ablauf, der Histologie usw. erscheint es notwendig, den genauen Mechanismus der beobachteten Phänomene zu analysieren, um neben deren allgemeiner Gültigkeit beurteilen zu können, inwieweit falsch positive und falsch negative Ergebnisse möglich sind. Zur Beurteilung der hier gewonnenen Ergebnisse sollen zunächst die wichtigsten Einflüsse der Histokompatibilität, der beteiligten Zellen, des Empfängerorganismus und der Immunsuppression diskutiert werde.

1. Immungenetik

Eine entscheidende Voraussetzung für die Auslösung einer Stimulation ist das Vorhandensein eines Histokompatibilitätsunterschiedes. Er beruht auf Zellmembranstrukturen, die genetisch determiniert sind und für die Auslösung von Immunreaktionen hauptverantwortlich sind. Da das morphologische Substrat dieser Strukturen noch weitgehend unbekannt ist, kann man sie selbst und die dafür verantwortlichen Gene nur durch ihre Wirkung definieren. Durch serologische Untersuchungsmethoden sowie durch Gewebstransplantationen wurden Antigene verschiedenster Bedeutung und Gewebsverteilung entdeckt. Neben den Erythrozyten-, Lymphozyten-, Thymozyten und Plasmazell-alloantigenen stellen die Histokompatibilitätsantigene die Wichtigsten dar. Es sind Antigene, die sich auf den Zellmembranen praktisch aller Organe in unterschiedlicher

Dichte finden, die bei der Maus genetisch vom H-System kontrolliert werden und einen entscheidenden Einfluß auf das Transplantationsergebnis haben (85c). Von den über 30 inzwischen entdeckten H-Loci ist der H-2 Locus der Bedeutendste. Transplantation über H-2 Differenz führt in der Regel innerhalb von drei Wochen zur Abstoßung eines Hauttransplantates. Es gibt keinen Hinweis dafür, daß irgendwelche anderen Antigene so stark sind wie die vom H-2 Locus determinierten, obwohl prinzipiell alle H-Loci Hautabstoßung verursachen können. Während alle schwachen H-Loci nur einige Allele besitzen, zeigt der H-2 Locus einen solch ausgeprägten Polymorphismus, daß er mittlerweile als Histokompatibilitätskomplex ("major histocomp.complex= MHC) bezeichnet wird, der in mehrere Regionen unterteilt wird (K,I,S,X,D) und dessen "Allele" als Haplotypen anzusehen sind.
Die Einteilung von Transplantationsversuchen in H-2 differente und H-2 identische liefert zwar zuverlässige Voraussagen über die Stärke der zu erwartenden Reaktion bei Organtransplantationen oder auch bei der gvhd (graft-versus-host disease). Für die proliferative Aktivität gemessen in einer gvhr oder MLC scheint dies nur bedingt zu gelten.

Bei den bislang bekannten Loci des MHC fällt auf, daß sie nicht nur für die Antikörperbildung sondern auch für die einzelnen Phasen der zellulär vermittelten Reaktion (Proliferation,Destruktion) unterschiedliche Bedeutung haben (45,90). Nach Untersuchungen von Klein (83) und Oppltva (110) rufen Differenzen der I-Region die stärkste , Differenzen der K- und D-Region schwächere Proliferation hervor. Die Entwicklung zytotoxischer Lymphozyten, nachgewiesen in der CML, wird vorwiegend durch die peripheren H-2 Regionen determiniert (109). Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß es sich nicht um einen Artefakt handelt, da in der CML vorwiegend T-Zellen als "targets" verwendet werde, die erforderlichen Zielantigene der

I-Region jedoch auf B-Zellen sitzen (85d).
Die Tatsache, daß Transplantation bei K- bzw. D- und I-Differenz eine wesentlich stärkere Lymphozytentoxizität bewirkt als bei Differenzen der peripheren Regionen alleine veranlaßte Bach, zwei Zellinien zu postulieren, die miteinander synergistisch wirken (11).
Ein Locus des MHC soll hier gesondert erwähnt werden, der Hybrid-Histokompatibilitätslocus (Hh-1). Es sind zwei Allele bekannt: Hh-1^{o} (AKR, C_3H, CBA) und Hh-1^{a} (C57BL/6). Letzteres bestimmt das Genprodukt, verhält sich jedoch rezessiv, während alle anderen H-2 Alloantigene kodominant ausgeprägt sind. Die besondere Bedeutung dieses Locus liegt darin, daß selbst letal bestrahlte F_1-Hybride hämatopoetische Parentalzellen abstoßen können, während ein Hauttransplantat angenommen wird ("hybrid resistance") (37,38). Ein ähnliches Phänomen wurde bei letal bestrahlten allogenen Tieren beobachtet; vermutlich ist für diese "allogeneic resistance" ebenfalls der Hh-Locus verantwortlich.

Differenzen in schwachen H-Loci bewirken jeweils nur geringe serologische oder zellulär vermittelte Reaktionen. Dabei kann sich jedoch die Wirkung mehrerer Loci addieren, d.h. die MLC ist bei Differenz in mehreren schwachen Loci ebenso stark wie im starken System (84).
Die Transplantation im schwachen System ruft nicht in jedem Fall eine gvhr hervor. So konnte Simonsen (132), Lengerova (90) und Eichwald (45) im Gegensatz zu anderen Autoren (36,125) keine gvhr nachweisen. Nach Untersuchungen von Cantrell (36) muß man annehmen, daß bei geeigneter Injektionsart, genügender Zellzahl und Vorimmunisierung jeder H-Locus eine gvhr auslösen kann, d.h. je schwächer der H-Locus desto höher ist die erforderliche Zellzahl, um so empfindlicher muß der verwendete Test sein und um so stärker wirkt sich die Vorimmunisierung aus.

Von den nicht-H-Loci seien noch zwei erwähnt:
Thy-1 (Thy-1.1 AKR; Thy-1.2 C_3H, CBA/J, C57BL/6): Er hat auf die Abstoßung eines Hauttransplantates kaum Einfluß; hingegen bewirkt er eine deutliche Antikörperproduktion (81) sowie eine relativ starke Proliferation in der MLC (112,113).
M-Locus (M^1 AKR; M^2 C57BL/6; M^3 C_3H; M^4 CBA): Er ist serologisch bislang nicht entdeckt worden und nur durch seine Wirkung in der MLC definiert. Er ruft in der MLC eine ebenso starke Reaktion hervor wie der H-2 Locus, hat jedoch für die Bildung toxischer Lymphozyten keinerlei Bedeutung (2,61).

Transplantationen im xenogenen System zeigen die Besonderheit, daß trotz des großen phylogenetischen Abstandes nur geringe Stimulationen erzielt werden. Nach anfänglichen Spekulationen über ein toxisches Mikroenvironment konnte Lafferty zeigen (92), daß xenogene Zellen im Empfänger überleben können und nach vorheriger Sensibilisierung auch eine gvhr hervorrufen können.
Ginsburg (69) zeigte, daß Rattenlymphozyten auf H-2 Antigene der Maus antworten können. Er schloß daraus, daß Rattenlymphozyten die H-2 Antigene so ansehen, als wären es Allele des Ag-B Locus, dem starken Locus der Ratte. Mit zunehmendem phylogenetischen Abstand nimmt die Ähnlichkeit der Antigene ab und damit die Häufigkeit derjenigen Lymphozyten, die auf diese Antigene noch antworten können. Erst durch Sensibilisierung des Spenders erhält man im Transplantat noch genügend Lymphozyten, die eine klinisch wahrnehmbare Reaktion hervorrufen können.

Eine eindeutige Erklärung für den Mechanismus obiger Reaktionen steht bislang noch aus. Es gilt jedoch als allgemein anerkannte Theorie, daß stimulierende wie antwortende Lymphozyten Strukturen tragen, sog. Rezeptoren, die sie befähigen, "selbst" von "fremd" zu unterscheiden.

Sie sind genetisch festgelegt und lösen bei Differenz DNS-Synthese, Blastentransformation, Zellproliferation und die Bildung zytotoxischer Lymphozyten aus. Nach Burnets "clonal selection theory" sind die Lymphozyten unipotent (12), während Simonsen pluripotente Lymphozyten postulierte (132).
Nach Brondz (5) scheint der T-Zellrezeptor kein rein passives Organ der Zellmembran zu sein, sondern ein aktives, von der Proteinsynthese stark abhängiges Element. So inhibiert das proteolytische Enzym Pronase zu 100% reversibel die Lymphozytenadsorbtion an das "target" (6). Er zeigt vorwiegend eine Carrier- und nur geringe Haptenspezifität. Zellen, die gegen ein bestimmtes Antigenmuster der H-2 Region sensibilisiert wurden, können dieses nur als Ganzes wiedererkennen, d.h. sie sind nicht toxisch für Zellen, die nur einen Teil dieser Antigene tragen. Die Antigene der K- bzw. D-Region werden getrennt erkannt, sodaß der T-Zellrezeptor zwar nicht poly- so doch als multispezifisch anzusehen ist.

Der Effektormechanismus scheint unspezifisch zu sein. Aus dem Überstand stimulierter T-Zellen läßt sich ein humoraler Faktor isolieren, PAR (product of antigen recognition) oder MIF (migration inhibitory factor) genannt, der u.a. die Eigenschaft hat, syngene wie allogene Lymphozyten zur Proliferation anzuregen und lysosomale Enzyme zu aktivieren (8,121,122). Er ist entscheidend an der Vermittlung der Toxizität beteiligt. Die Stabilisierung der lysosomalen Membran mit Chloroquin oder die Inaktivierung lysosomaler Enzyme blockiert in vitro den zytotoxischen Effekt ohne die Adsorbtion an das "target" und die Blastentransformation zu behindern (7). Werden die Effektorzellen und das "target" durch eine Milliporemembran getrennt, bleibt die toxische Wirkung aus (114,152). Entscheidend scheint jedoch nur die unmittelbare Nähe zu sein und nicht die Membran-

struktur des "targets", da es etliche Befunde gibt, die eindeutig zeigen, daß sich die Toxizität stimulierter T-Zellen auch gegen syngene Zellen richtet (50,51,126,127, 135). Dabei muß betont werden, daß die Absonderung von PAR nicht von der Teilungsfähigkeit der Zelle abhängig ist, sondern nur von deren Fähigkeit zur Proteinsynthese. Dies erklärt auch das von Lafferty als "allogene Stimulation" bezeichnete Phänomen, nämlich die "Stimulation" von F_1-Zellen durch Mitomycin C-blockierte Parentalzellen oder die Entwicklung einer gvh ohne Spenderzellproliferation (9,79,91,106).
Einige Autoren konnten nachweisen, daß stimulierte T-Zellen schon im Blastenstadium toxische Eigenschaften haben (28,111,122).
Diese Befunde lassen vermuten, daß die Entwicklung der Zytotoxizität und der Proliferation zwei Vorgänge sind, die normalerweise parallel ablaufen, aber an sich jedoch unabhängig voneinander sind und sich u.U. auch getrennt beeinflussen lassen (130,156-160).

2. Die Spenderzellen

Die Träger der immunologischen Reaktionen sind die Zellen des lymphatischen Systems einschließlich der Thymusdrüse und des Knochenmarkes. Sie zeigen morphologisch ein sehr einheitliches Bild, sind aber in funktioneller Hinsicht sehr heterogen.
Immunkompetente Zellen finden sich fast nur unter den peripheren kleinen Lymphozyten (63-65), während die Zentralorgane Thymus und Knochenmark im Wesentlichen nicht-immunkompetente Vorstufen enthalten (96).
Funktionell kann man zwei Hauptgruppen unterscheiden, die morphologisch nicht zu unterscheiden sind, jedoch mittlerweile durch eine spezielle Peroxydasemarkierung auch sichtbar gemacht werden können (71):

B-Zellen ("bone marrow derived"): Sie stammen direkt von Vorstufen des Knochenmarks ab und sind für die Vermittlung der humoralen Immunität in Form der Antikörperbildung verantwortlich.

T-Zellen ("Thymus derived"): Ihre Vorstufen stammen ursprünglich auch aus dem Knochenmark, benötigen zur weiteren Ausreifung jedoch obligat den Einfluß einer intakten Thymusdrüse. Sie tragen ein gemeinsames Antigen (theta= Thy-1) und sind verantwortlich für die vermittlung der zellulären Immunität wie Transplantatabstoßung, gvhd und verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion (85b).

B-Zellen sind kleine kurzlebige Lymphozyten (Tage bis Wochen), die zum größten Teil nicht rezirkulieren. Sie stellen etwa 35% aller Lymphozyten eines Lymphknotens und ca. 75% in der Milz (44). In besonders hoher Konzentration finden sie sich in den Keimzemtren der Lymphknoten und in den Follikeln der weißen Milzpulpa.
Auf dem Weg durch den ductus thoracicus in die Blutbahn und das Gewebe gehen sie vermutlich zu Grunde bzw. differenzieren nach Antigenkontakt in Plasmazellen und memory cells aus. Die Antikörperbildung erfolgt ausschließlich durch Plasmazellen. Es besteht jdoch ein Synergismus zu den T-Zellen, die die Antikörperbildung in Form der "helper cells" spezifisch verstärken und beschleunigen können, ohne jedoch selbst Antikörper zu bilden (35,62,100, 123,154).
Das T-Zellsystem ist komplizierter aufgebaut; schon in der Embryonalentwicklung wandern Stammzellen aus dem Knochenmark in die Thymusdrüse ein. Dort findet der Reifungsproze: zur endgültigen T-Zelle statt, die die Thymusdrüse in die Blutbahn verläßt und sich in den thymusabhängigen Arealen der peripheren lymphatischen Organe ansiedelt (85b). Dies sind im Lymphknoten die parakortikale Pulpa und in der Milz die periarteriellen Lymphozytenmäntel (56). T-Zellen haben eine Lebensdauer

von einigen Wochen bis Monaten (29,64,108), wandern durch den ductus thoracicus ins Blut, von dort zum größten Teil durch die postkapillären Venolen (98,129) und zum geringeren Teil durch das Gewebe (155) in die Lymphknoten zurück. Die Lymphknoten des ductus thoracicus bestehen zu ca. 90% aus langlebigen rezirkulierenden T-Zellen, die des Blutes und der Lymphknoten nur zu ca. 60% sowie die der Milz zu ca. 30% (44).

Von den T-Zellen sind drei Differenzierungsarten bekannt:

1. helper cells (s.o.)
2. memory cells, verantwortlich für eine beschleunigte Sekundärantwort bei zellulärer und humoraler Immunität (85b)
3. killer oder effector cells, die unmittelbare zytotoxische Fähigkeiten haben.

T-Zellen sind allein zur Vermittlung der zellulären Immunität fähig. Man kann allerdings einen unspezifischen Synergismus zu den B-Zellen nachweisen, bei dem letztere nur die Stärke der Reaktion beeinflussen, aber nicht deren Spezifität (15,16,76).

Es gibt Hinweise, daß die T-Zellpopulation ebenfalls heterogen ist (1,23). Eine Untergruppe, T_1-Zellen genannt, findet sich vorwiegend in Thymus und Milz; diese Zellen rezirkulieren kaum, sind relativ unempfindlich gegenüber ATS und Kortison, bestimmen die Spezifität der Reaktion und vermitteln die Toxizität. Sog T_2-Zellen kommen am häufigsten im Lymphknoten und Blut vor, rezirkulieren schnell und sind gegenüber ATS und Kortison in vivo extrem emdfindlich. Sie reagieren besonders stark mit Proliferation und verstärken die Toxizität der T_1-Zellen ("amplifier cells") (23,32-34,104).

Inwieweit T_1 und T_2 Zellen getrennte Zellinien darstellen, die von Thymuszelluntergruppen abstammen (104,128) oder auseinander hervorgehen und damit verschiedene Reifestadien derselben Zelle repräsentieren, läßt sich bislang noch nicht entscheiden.

Neben der synergistischen ist auch eine antagonistische Wirkung der T-Zellen bekannt. Nach antigener Stimulation können sog. "suppressor cells" gebildet werden, die syngene Zellen bei der Entwicklung einer gvh behindern (22, 46,72). Da es über den Mechanismus nur vage Vorstellungen gibt (humoraler Faktor ?), läßt sich deren Einfluß auf obige Versuche nicht beurteilen.
Es ist weiterhin nicht bekannt, inwieweit die hier beschriebenen T-Zelluntergruppen mit den von Huhn (71) mittels Peroxydasemarkierung identifizierten $T_{1,2,3}$ Zellen identisch sind.

Die Stimulation der T-Zellen ist abhängig von der Darbietung der Antigene. Intakte Zellen stimulieren mehr als Zellbruchstücke, Lymphozyten erheblich mehr als Stroma- und Parenchymzellen (47,50,51,95,97). Dabei ist direkter Kontakt zur Antigenerkennung obligat notwenig (6).

Andere Leukozyten sind bei der Entwicklung einer gvh nur am Rande beteiligt. Bisherige Befunde deuten daraufhin, daß Makrophagen, die im histologischen Bild z.T. stark in den Vordergrund treten, an der Auslösung der Immunreaktion nicht beteiligt sind. Sie können jedoch eine ablaufende Reaktion in ihrer Stärke beeinflussen (1,55, 147,148,149).

Die Bedeutung der Spenderzellproliferation ist noch umstritten. Nach Elkins (49) ist sie streng antigenspezifisch, d.h. sie unterbleibt, wenn der Spender gegenüber dem vorgesehenen Empfänger vorher tolerant gemacht wurde. Da die Proliferationsphase in engem zeitlichen Zusammenhang mit den entstehenden Gewebsläsionen steht und die Übertragung der gvh auf einen zweiten Wirt auch nur während der Proliferationsphase gelingt, schloß er daraus, daß die Spenderzellproliferation obligat für die Entwicklung von Effektorzellen und ein direktes Maß für die immunologische Aktivität der Spenderzellen gegen den Empfänger ist. Nowell (107)

bestätigte dies, indem er eine enge Korrelation zwischen der Schwere des "runting" und der Spenderzellproliferation nachwies. Diese Befunde schließen jedoch nicht aus, daß die Proliferation zwar eine sehr häufige, im Grunde jedoch unwesentliche Begleitreaktion der gvh darstellt. In diesem Sinne ist die Tatsache zu interpretieren, daß Proliferations- und Destruktionsphase durch einige Loci verschieden stark beeinflußt werden (s.o.), vermutlich durch verschiedene Zellen vermittelt werden und auch durch Immunsuppressiva verschieden beeinflußt werden. (156-160). So konnte Nakic (105) im Verlauf einer akuten gvh nach Transplantation von C57BL/6 auf CBA_{T66} relativ viel Spenderzellen im lymphatischen Gewebe des Empfängers nachweisen; bei Transplantation von CBA_{T66} auf C57BL/6 fanden sich jedoch bei gleich stark ausgeprägtem klinischen Syndrom kaum Spenderzellen im Empfänger.

3. Mechanismus der Lymphknotenvergrößerung

Das histologische Bild des regionalen Lymphknotens nach subkutaner Injektion allogener Zellen in die Fußsohle einer Maus, zeigt einen charakteristischen Verlauf:
Vom 2.-5. Tag nach der Injektion findet man eine zunehmende massive Anhäufung mononukleärer Zellen vorwiegend in der parakortikalen Medulla, den parakortikalen Sinus und den postkapillären Venolen; das Lymphknotenstroma ist weitgehend überlagert, Keimzentren nicht erkennbar, die Sinus dilatiert.
Vom 5.-7. Tag an treten zunehmend große pyroninophile Blasten, Histiozyten und Plasmazellen auf; Retikulumzellen und das Endothel der postkapillären Venolen beginnen zu proliferieren, das zunächst hohe Endothel zeigt bald Degenerationserscheinungen, vereinzelt Nekrosen, an denen Lymphozyten durchtreten (82).
Dieses Bild ähnelt dem der lokalen gvhr der Niere (47,51); hierbei beobachtete Elkins nach dem 7. Tag typischerweise

eine Infiltration des Nierenparenchyms mit mononukleären Zellen sowie Nekrosen von Tubulusepithelien, die in unmittelbarer Nähe der Infiltratinseln liegen.
Dieser Verlauf in zwei Phasen, einer proliferativen und einer destruktiven, findet sich ebenfalls bei der generalisierten gvhd (66,63). Die Annahme, daß die Milz- bzw. Lymphknotenvergrößerung auf die Spenderzellproliferation zurückzuführen sei, hat sich jedoch nicht bestätigt.
Nach Untersuchungen von Monie (101,102) stammen ca. 75% der Mitosen eines vergrößerten Lymphknotens vom Empfänger selbst. Über 90% davon sind kurzlebige Lymphozyten (103). Auf Grund der genetischen Konstellation und der Tatsache, daß Röntgenbestrahlung die gvhr weitgehend unterdrückt, anschließende Gabe von syngenem Knochenmark den Bestrahlungseffekt wieder aufhebt (25)[26], kann man sicher schließen, daß die Empfängerzellproliferation unspezifisch ist, da immunkompetente Zellen erst nach 2-3 Wochen wieder auftreten (93).
Als weitere Ursachen für die Lymphknotenvergrößerung muß man neben der Zellvergrößerung (viele Blasten !) ein sog. "Lymphozytentrapping" annehmen (24,53), d.h. durch den verlangsamten Lymphstrom in den dilatierten Sinus und durch den Übertritt von Lymphozyten aus der Blutbahn durch das z.T. zerstörte Endothel der postkapillären Venolen, werden rezirkulierende Lymphozyten vermehrt im Lymphknoten zurückgehalten. Der quantitativ größte Teil des "trapping" ist unspezifisch (54,70,139), während ein kleiner Teil auch spezifisch eingefangen wird (54,136,139).
Die Ursache für die starke Beteiligung des Empfängerorganismus an der Lymphknotenvergrößerung ist möglicherweise in folgendem Effect zu suchen : Untersuchungen über die Wirkungsweise von Adjuvantien zeigen, daß bestimmte Stoffe mit sog. "extrinsic adjuvanticity", d.h. Stoffe ohne eigene antigene Eigenschaften in

begrenztem Umfang Immunreaktionen auslösen können. Ihre subkutane Injektion in die Rattenfußsohle verursacht im regionalen Lymphknoten eine Zellvermehrung sowie eine Blastentransformation in der parakortikalen Medulla (138). Als Ursache nimmt man an, daß Adjuvantien das RES (120), Lymphozyten und Plasmazellen (4) unspezifisch stimulieren können sowie die physikalische Struktur des Lymphknotens so verändern, daß durch die postkapillären Venolen vermehrt Lymphozyten einströmen und mit der efferenten Lymphe weniger abfließen (40,150).
Weiterhin muß man damit rechnen, daß der Empfänger auf die entstandenen Gewebsläsionen mit einer Entzündungsreaktion antwortet, da die Toxizität der Spenderzellen schon nach 2-3 Tagen einsetzt (6). Das histologische Bild ist hierfür jedoch untypisch. Die Granulozyten treten zu Gunsten der Makrophagen weitgehend in den Hintergrund. Den quantitativ größten Einfluß auf die Lymphknotenvergrößerung dürfte jedoch das von den Spenderzellen abgesonderte PAR besitzen (122; s.S. 37)

Möglicherweise gibt es noch einen unspezifischen Abwehrmechanismus des Empfängers, der erstmals von Field beschrieben wurde (59,60). Er stellte fest, daß bei fraktionierter Zellgabe die nachfolgenden Injektionen wesentlich schwächere Reaktionen auslösten als die erste. Ein nachfolgendes Hauttransplantat wurde angenommen als Zeichen dafür, daß keine Sensibilisierung stattgefunden hat. Dieser Effekt ist mit dem peripheren Blut übertragbar auf syngene Hybride und auch in thymektomierten und bestrahlten Tieren auslösbar. Eine Erklärung dafür, vorallem inwieweit dieser Effekt schon bei der ersten Injektion zum Tragen kommen kann, steht bislang noch aus.

Man kann insgesamt annehmen, daß die Empfängerzellreaktion zwar immunologisch unspezifisch ist, aber doch weitgehend durch die aktivierten Spenderzellen induziert wird.

4. Immunsuppression

Das ALS hat neben einer toxischen Wirkung auf Knochenmarksstammzellen (43), Zellen der myeloischen Reihe und Parenchymzellen eine stark toxische Wirkung auf die Zellen der lymphatischen Reihe (143-145). Es bewirkt im Empfänger eine erhebliche Lymphopenie (142,146) und eine Verlängerung der Überlebenszeit eines Hauttransplantates (94). Jedoch vermag es in Thymus, Milz und Lymphknoten nur in geringem Umfang einzudringen (41,146); nach Untersuchungen von Denman setzt in diesen Organen eine kompensatorische Lymphopoese ein, sodaß insgesamt keine dauerhafte Unterdrückung der hvg resultiert (42).

Ionisierende Strahlen haben auf Grund ihres Photoeffektes eine stark zellzerstörende und proliferationshemmende Wirkung. Jedoch ist auch eine Bestrahlung von 1200 r und darüber nicht in der Lage, die hvg wirksam zu unterdrücken(3,118). Offensichtlich sind einige strahlenfeste immunkompetente Lymphozyten in der Lage, noch eine hvg in Gang zu setzen.
Die Kombination von ALS und Bestrahlung ergänzen sich hingegen so wirkungsvoll, daß im Lymphknotentest keinerlei Reaktion mehr nachweisbar ist (118) und nach Knochenmarkstransplantation Langzeitchimären möglich sind (13,117). Dies bedeuted jedoch nicht die völlige Reaktionsunfähigkeit des Empfängers, sondern nur, daß die immunkompetenten Zellen quantitativ so stark vermindert und deren Regenerationsfähigkeit aus Vorstufen so eingeschränkt wurde, daß das heterologe Knochenmark nicht mehr abgestoßen werden kann. Weiterhin erscheint es fraglich, inwieweit man den Nachweis einer Unterdrückung der hvg im Lymphknotentest mit der gvh Situation vergleichen kann.
Bei Transplantation von F_1-Zellen auf Parentaltiere verhalten sich die Spenderzellen im Empfänger weitgehend indifferent, sodaß durch die starke Lymphopenie eine u.U. noch mögliche Antigenerkennung unmöglich wird.

Bei Transplantation von Parentalzellen auf Hybride findet jedoch zunächst ein starkes "trapping" statt. Durch die Lymphozytenkonzentration besteht eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, noch reaktionsfähige Lymphozyten nachzuweisen. Dabei ist es gleichgültig, ob diese noch proliferieren können; für die Lymphknotenvergrößerung ist es entscheidend, daß sie leben und zur Proteinsynthese fähig sind (s.S. 38).

Das zur Inkubation der Spenderzellen verwendete ATG ist wesentlich spezifischer als das ALG. Rodt und Mitarbeiter entwickelten ein Verfahren, das die kontaminierenden Antikörper weitgehend entfernt, sodaß das gereinigte Serum nur noch T-Zell spezifisch ist. Bei vernachlässigbar geringer Stammzell- und B-Zelltoxizität wird die akute gvh nach Knochenmarkstransplantation völlig unterdrückt(115). Es wirkt durch Opsonisation (10) und Zellysis; ein bloßes coating durch das Fab-Fragment erwies sich als wirkungslos (116). Bislang gibt es keinen Anhalt dafür, daß nur ein Teil der T-Zellen erfasst wird; nach Untersuchungen von Huhn (71) besteht zwar die Möglichkeit, daß ein kleiner Teil der T-Zellen vorübergehend das Theta-Antigen verliert und damit ein kleiner Teil der T-Zellen der ATG Wirkung entgeht. Nach den Transplantationsergebnissen erscheint dies jedoch ohne klinische Bedeutung zu sein.

5. Eigene Ergebnisse

Die Ergebnisse der Versuchsgruppe I zeigen, daß die Injektion von reinem Medium keinerlei Lymphknotenvergrößerung ergibt, d.h. die nicht unerhebliche Gewebstraumatisierung mit der damit verbundenen Infektionsgefahr spielt im Rahmen dieser Versuche keine Rolle. Die lokale Infektion bleibt dennoch eine Verfälschungsmöglichkeit (140), sodaß sterile Arbeitsbedingungen trotzallem unerläßlich erscheinen.

Die durch Injektion syngener Zellen verursachte Stimulation ist geringfügig, aber signifikant (Abb. 1 D,E). Sie ist wahrscheinlich auf die hohe Zahl mechanisch eingefangener Spenderzellen und deren "extrinsic adjuvanticity" zurückzuführen, wobei sich letzteres in den vorbehandelten Empfängern weiger stark auswirken kann und daher eine geringere Vergrößerung resultiert (Abb. 1 D). Inwieweit noch eine Spenderzellproliferation beteiligt ist, die durch die Lymphopenie des Empfängers induziert sein kann, läßt sich hier nicht beurteilen. Eine Stimulation durch ATS und Komplement spielt sicher eine untergeoednete Rolle. Als heterologe Proteine besitzen sie zwar auch eine "intrinsic adjuvanticity" (89,138); im Vergleich zur Kontrollgruppe besteht jedoch praktisch kein Unterschied (Abb. 1 C,D).
Der Einfluß eines evtl. auftretenden Lymphknotenödems kann hier unberücksichtigt bleiben, da die Lymphknoten nach der Präparation in Aceton entwässert wurden.

Der einzige Parameter, der einen signifikanten Einfluß auf das Lymphknotengewicht zeigt, ist das Empfängertieralter, das möglichst eng toleriert werden sollte.
Da es bislang keinen Hinweis auf eine entsprechende Bedeutung des Spenderzellalters gibt, wurde auf dessen Testung verzichtet.

Die radioaktive Markierung hat im Wesentlichen dieselben Resultate geliefert wie bei Baines (31). Vorallem hinsichtlich der Streuung der Werte ergeben sich zwischen Markierung und Wägung keine Unterschiede, d.h. Ungenauigkeiten bei der Präparation stellen auch bei der Wägung einen vernachlässigbar kleinen Fehler dar.

Insgesamt ergibt sich für einen in vivo Test eine gute Reproduzierbarkeit, d.h. zwischen den Wiederholungsversuchen besteht kein signifikanter Unterschied. Einzelne stark abweichende Ergebnisse sind vermutlich auf lokale oder allgemeine Infektionen zurückzuführen. Es erscheint daher

angebracht, stark unterschiedliche Resultate nicht zu poolen, sondern den Versuch nochmals zu wiederholen. Werden wiederholt signifikant unterschiedliche Lymphknotengewichte gemessen, kann man mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, daß diese nicht das Ergebnis von Artefakte ist, sondern auf einer wenn auch unspezifischen Wechselwirkung zwischen Spenderzellen und Empfängerorganismus beruhen.

Auf diesem Hintergrund ist es zunächst überraschend, daß die Stimulation im starken, schwachen und xenogenen System fast gleich groß ist. Dies mag z.T. darauf zurückzuführen sein, daß einige schwache Loci die Proliferationsphase besonders stark beeinflussen unabhängig von der resultierenden Destruktionsphase (s.S. 33 f.). Es bleibt jedoch die Frage offen, warum die Stimulation im starken System bei den Hybridempfängern etwa doppelt so groß ist wie bei den Parentalempfängern trotz gleicher Vorbehandlung und identischer antigener Differenz. Offensichtlich hat der Empfängerorganismus trotz der massiven immunsuppressiven Vorbehandlung noch einen erheblichen Einfluß auf die Lymphknotengröße, in dem Sinne, daß der parentale Empfänger im Gegensatz zum Hybrid die Entwicklung der gvh behindern kann. Dabei mag das Lymphozytentrapping eine entscheidende Rolle spielen, da es trotz der allgemeinen Lymphopenie einen engen Kontakt zwischen den Spenderzellen und den Empfängerlymphozyten als "targets" ermöglicht. Nach dem oben beschriebenen Mechanismus der Lymphknotenvergrößerung, der Wirkungsweise der Effektorzellen und dem Einfluß der Immunsuppressiva erscheint es möglich, daß sich hier noch eine hvg manifestiert in Form von Empfängerzelltoxizität, die jedoch bei der Knochenmarkstransplantation nicht mehr zum Tragen kommt. Dies würde auch die Annahme bestätigen, daß die Proliferation anfänglich die Erscheinungen der Toxizität nur überdeckt, daß aber beide

Phasen gleichzeitig stattfinden. Wird die Proliferation durch die Empfängervorbehandlung unterdrückt, überwiegt die Auswirkung der Toxizität. Die Tatsache, daß im Versuch 9 a,b die Inkubation der Spenderzellen in ATS und Komplement die Reaktion bis zur syngenen Kontrolle unterdrückt, ist demnach nicht als alleinige ATS-Wirkung anzusehen, sondern auf die aktive Unterdrückung der unspezifischen Restproliferation durch die hvg zurückzuführen.
Das Trapping ist wohl auch der Grund für die große Empfindlichkeit des Lymphknotentests. Trotz der starken Immunsuppression wird auch im schwachen und xenogenen System im Gegensatz zum Splenomegalietest eine deutliche Reaktion gemessen.

Die Tatsache, daß die Inkubation in reinem ATS praktisch in keinem Versuch eine signifikante Wirkung geteigt hat, läßt sich damit deuten, daß der Antikörper allein noch keine toxische Wirkung hat. Das Mäusekomplement ist weder in qualitativer noch quantitativer Hinsicht ausreichend (68), um die Spenderzellen zu töten. Erst durch die in vitro Inkubation mit Meerschweinchenkomplement kann das ATS seine volle Toxizität entfalten; durch dieses Verfahren wurde in fast allen Spender-Empfängerkombinationen die gvhr signifikant unterdrückt. Die noch verbleibende Vergrößerung beträgt maximal das doppelte des kontralateralen Lymphknotens. Sie wird vermutlich durch die noch intakten B-Zellen hervorgerufen, da die T-Zellen durch Inkubation abgetötet sind und andererseits nekrotische Zellen keinerlei Lymphknotenvergrößerung mehr hervorrufen können (Abb. 12 F). Inwieweit die B-Zellen von sich aus proliferieren oder erst ein trapping induzieren und durch Empfänger-T-Zellen dazu angeregt werden, läßt sich hier nicht entscheiden. Es bleibt ebenfalls Spekulation, ob die Restvergrößerung nicht Ausdruck dafür ist, daß einige T-Zellen durch Verlust des theta-Antigens der ATS Wirkung entgangen sind.

Zusammenfassung

Der Lymphknotentest in der hier verwendeten Variante ist einfach durchzuführen und zeigt sich trotz großer Empfindlichkeit nur in geringem Maße durch Artefakte beeinflußbar. Andererseits werden auch spezifische und unspezifische Effekte registriert, die klinisch nicht mehr relevant sind.
Gemessen wird nicht die gvh direkt, sondern die Reaktion des Empfängerorganismus auf die Aktivität der Spenderzellen während der Proliferationsphase. Die Tatsache, daß Proliferations- und Destruktionsphase durch einige Loci unterschiedlich beeinflußt werden, daß beide Phasen vermutlich von verschiedenen Zellen getragen werden und durch Immunsuppressiva unterschiedlich beeinflußt werden können, läßt erkennen, daß man aus der Proliferation nur bedingt Voraussagen auf die zu erwartende Toxizität machen kann. Andererseits entspricht die Lymphknotenvergrößerung in etwa dem Histokompatibilitätsunterschied und der Zahl der transplantierten Zellen vorallem im starken System. Bei immunsuppressiver Vorbehandlung von Spender oder Empfänger sowie im schwachen und xenogenen System gilt dies nur noch mit Einschränkung, da bei geringer Stimulation Effekte an Einfluß gewinnen, die für die Klinik der Transplantation nicht mehr von Bedeutung sind. Daraus ergibt sich, daß der Lymphknotentest hinsichtlich der Eindeutigkeit der Ergebnisse und deren Quantifizierbarkeit als screening Test geeignet ist; im Einzelfall bedarf das Ergebnis jedoch der Bestätigung z.B. durch ein Hauttransplantat. Im Sinne eines "typing" ist der Test nicht verwendbar.
Im Rahmen seiner Aussagefähigkeit konnte im Lymphknotentest die immunsuppressive Wirkung des ATS voll bestätigt werden.

Literaturverzeichnis

1. Argyris B. — The role of macrophages, thymus- and bone marrow-derived cells in the graft-versus-host reaction. Transpl. 17, 387, 1974

2. Abbasi K. Demant,Holmes — Mouse mixed lymphocyte reactions and cell-mediated lympholysis: Genetic control and relevance to antigenic strength. Transplant. Proc. 5, 1329, 1973

3. Van Bekkum de Vries — Radiation Chimeras. Logos Press Ltd, Acad. Press London Ltd., 128, 1967

4. Beneke G. Finger — Einfluß von Bordetella Pertussis auf das lymphatische Gewebe von Mäusen. II. Proliferierende Zellsysteme in der Milz. Z. Med. Microbiol. Immunol. 154, 178, 1968

5. Brondz B.D. — Effect of actinomycin D and puromycin on the in vitro cytotoxic activity of lymphocytes. Transplant. Proc. 1, 416, 1969

6. Brondz B.D. — Lymphocyte receptors and mechanisms of in vitro cell-mediated immune reactions. Transplant. Rev. 10, 112, 1972

7. Brondz B.D. Snegiröva Rasulin — Effect of enzymes, polysaccharides and lysosome-active drugs on interaction of immune lymphocytes with allogeneic target cells. Progress in Immunology, ed. Amos,D.B., p.447 Acad. Press, New York

8. Bloom B.R. Bennett — Migration inhibitory factor associnated with delayed-type hypersensitivity. Fed. Proc. 27, 13, 1968

9. Boehmer H. Separation of T and B lymphocytes and their role in the mixed lymphocyte reaction. J. Immunol. 112, 70, 1974

10. Lydyard P.M. Ivanyi The role of opsonization in antithymocyte globulin-induced suppression of graft-versus-host reaction in chick embryos. Transpl. 17, 400, 1974

11. Bach M.L. Segall,Zier Cell mediated immunity: Separation of cells involved in recognitive and destructive phases Science 180, 403, 1973

12. Burnet F.M. Cellular immunology Melbourne Univ. Press, Melbourne 1969

13. Bau J. Thierfelder Antilymphocytic antibodies and marrow transplantation. I. The effect of anti-lymphocyte serum on xenogeneic engraftment. Transpl. 15, 564, 1973

14. Bain G.O. Distribution, dose dependency and effect of donor presensitization on liver infiltration in the gvh reaction. Transpl. 9, 383, 1970

15. Barchilon J. Gershon Synergism between thymocytes and bone marrow cells in a graft-versus-host reaction. Nature 227, 71, 1970

16. Blessing J. Associated thymus and bone marrow cells: Synergism in graft-versus-host reaction. Experientia 29, 478, 1972

17. Billingham R. Reactions of grafts against their hosts. Science 130, 947, 1959

18. Billingham R. Brent A simple method of inducing tolerance of skin homografts in mice. Transpl. Bull. 4, 67, 1957

19. Billingham R. Brent — Quantitative studies on tissue transplantation immunity. IV. Induction of tolerance in newborn mice and studies on the phenomenon of runt disease. Phil.Trans.Roy.Soc. London B 242, 439, 1959

20. Billingham R. Brown,Defendi — Quantitative studies on the induction of tolerance of homologous tissue and on runt disease in the rat. Ann. N.Y. Acad. Sci. 87, 457, 1960

21. Blomgren H. Andersson — Inhibition of erythroid cell growth in irradiated mice by allogeneic lymphoid cells: A quantitative method for graft-versus-host reactivity of lymphoid cells. Cell. Immunol. 3, 318, 1972

22. Blomgren H. Jacobsson — Interaction between thymocytes and lymph-node cells in the graft-versus-host response: Evidence for a synergistic and an antagonistic activity mediated by mouse thymocytes. Cell. Immunol. 12, 296, 1974

23. Blomgren H. — Synergism between thymocytes and lymph node cells in the graft-versus-host response. Effect of cortisone treatment of the thymus cell donor. J. Immunol. 110, 144, 1973

24. Zatz M. Lance — The distribution of ^{51}Cr-labeled lymphocytes into antigen-stimulated mice. Lymphocyte trapping. J. Exp. Med. 134, 224, 1971

25. Bonney W. Feldbush — Graft-versus-host reaction in the rat popliteal lymph node. The host component. Transpl. 15, 215, 1973

26. Bonney W. Feldbush — Host contribution to localized popliteal node graft-versus-host reaction. Fed. Proc. 31, 785, 1972

27. Boyer G. — Chorioallantoic membrane lesions produced by inoculation of adult fowl leucocytes. Nature 185, 327, 1960

28. Brent L. Medawar — Quantitative studies on tissue transplantation immunity. VII. Normal lymphocyte transfer reaction. Proc.R.Soc. Lond. B Biol. Sci. 165, 281, 1966

29. Brunner K.T. Mauel,Rudolf — Studies on allograft immunity in mice. I. Induction, development and in vivo assay of cellular immunity. Immunology 18, 501, 1970

30. Burnet F.M. Boyer — The chorio-allantoic lesion in the Simonsen phenomenon. J. Path. Bact. 81, 141, 1961

31. Baines M.G. Micklem — A method for the quantitation of the localized graft-versus-host response in the mouse by uptake of ^{125}IUdR. Transpl. 20, 512, 1975

32. Cantor H. — The effects of anti-theta antiserum upon graft-versus-host activity of spleen and lymph node cells. Cell. Immunol. 3, 461, 1972

33. Cantor H. Asofsky — Synergy among lymphoid cells mediating the graft-versus-host response. II. Synergy in gvh reactions produced by Balb/c lymphoid cells of differing anatomic origin. J. Exp. Med. 131, 235, 1969

34. Cantor H. Asofsky — Synergy among lymphoid cells mediating the graft-versus-host response. III. Evidence for interaction between two types of thymus-derived cells. J. Exp. Med. 135, 764, 1972

35. Claman H.N. Chaperon — Thymus-marrow cell combinations. Synergism in antibody production. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 122, 1167, 1966

36. Cantrell J.L. Hildemann — Characteristics of disparate histocompatibility barriers in congenic strains of mice. I. Graft-versus-host reactions. Transpl. 14, 761, 1972

37. Cudkowicz G. Stimpfling — Deficient growth of C57BL marrow cells transplanted in F_1 hybrid mice. Immunology 7, 291, 1964

38. Cudkowicz G. Bennett — Peculiar immunobiology of bone marrow allografts. II. Rejection of parental grafts by resistant F_1 hybrid mice. J. Exp. Med. 134, 1513, 1971

39. Dempster W.J. — Kidney homotransplantation. Brit. J. Surg. 40, 447, 1953

40. Dresser D.W. Taub,Krantz — The effect of localized injection of adjuvant material on the draining lymph node. II. Circulating lymphocytes. Immunology 18, 663, 1970

41. Denman A.M. Frenkel — Mode of action of anti-lymphocyte globulin. I. The distribution of rabbit anti-lymphocyte globulin injected into rats and mice. Immunology 14, 107, 1968

42. Denman A.M. Frenkel — Mode of action of anti-lymphocyte globulin. II. Changes in the lymphoid cell population in rats treated with anti-lymphocyte globulin. Immunology 14, 115, 1968

43. DeMeester Andersson — The effect of heterologous antilymphocyte serum on mouse hemopoietic stem cells. J. Exp. Med. 127, 731, 1968

44. Everett N.B. Caffrey,Rieke — Recirculation of lymphocytes. Ann. N.Y. Sci. 113, 887, 1964

45. Eichwald E. Hart — Genetic aspects of the gvh reaction of mice. Folia Biol. (Praha) 15, 254, 1969

46. Elkins W. — Cellular control of lymphocytes initiating graft-versus-host reactions. Cell. Immunol. 4, 192, 1972

47. Elkins W. — The interaction of donor and host lymphoid cel in the pathogenesis of renal cortical destruct induced by a local graft-versus-host reaction. J. Exp. Med. 123, 103, 1965

48. Elkins W. — Invasion and destruction of homologous kidney by locally inoculated lymphoid cells. J. Exp. Med. 120, 329, 1964

49. Elkins W. — Specific and nonspecific lymphoid cell proliferation in the pathogenesis of graft-versus-host reactions. Transpl. 9, 273, 1970

50. Elkins W. — The source of immunogenic stimulation of lymphoid cells mediating a local graft-versus-host reaction in rat kidney. Transpl. 11, 551, 1971

51. Elkins W. — Pathogenesis of a local graft-versus-host reaction: Immunogenicity of circulating host lymphocytes. Science 159, 1250, 1968

52. Emeson E. Thursh — The popliteal lymph node graft-versus-host assay in mice. Fed. Proc. 32, 972, 1973

53. Emeson E. Thursh — Mechanism of graft-versus-host induced lymphadenopathy in mice. Trapping versus proliferation. J. Exp. Med. 137, 1293, 1973

54. Emeson E. Thursh — Immunologically specific retention of long-lived lymphoid cells in antigenically stimulated lymph nodes. J. Immunol. 106, 635, 1970

55. Feldman J. Unanue — Role of macrophages in delayed hypersensitivity II. Effects of anti-macrophage antibody. Cell. Immunol. 2, 275, 1971

56. Ford W. L. — The immunological and migratory properties of the lymphocytes recirculating through the rat spleen. Br. J. exp. Path. 50, 257, 1969

57. Ford W.L. Burr, Simonsen — A lymph node weight gain assay for the graft-versus-host activity of rat lymphoid cells. Transpl. 10, 258, 1970

58. Ford W.L. — A local graft-versus-host reaction following intradermal injection of lymphocytes in the rat. Brit. J. Exp. Path. 48, 335, 1967

59. Field E.O. Cauchi, Gibbs — The transfer of refractoriness to gvh disease in F_1-hybrid rats. Transpl. 5, 241, 1967

60. Field E.O. Gibbs — Reduced sensitivity of F_1 hybrid rats to re-challenge with parental strain spleen cells. Clin. exp. Immunol. 1, 195, 1966

61. Festenstein H. Sachs — Genetic studies of the mixed lymphocyte reaction in H-2 identical mice. Immunogenetics of the H-2 System, Lengerova, Vojtiskova (eds), p. 170, Karger, Basel 1971

62. Gordon J. Yu — Relationship of T-cells involved in cell-mediated immunity and antibody synthesis. Nature New Biology 244, 21, 1973

63. Gowans J.L. — The fate of parental strain small lymphocytes in F_1 hybrid rats. Ann. N.Y. Acad. Sci. 99, 432, 1962

64. Gowans J.L. McGregor — The immunological activities of lymphocytes. Progr. Allergy 9, 1, 1965

65. Gowans J.L. Gesner,McGregor — The immunological activity of lymphocytes. Biological activity of the leucocyte. Ciba Found. Study Group no. 10, 32, Churchill London 1961

66. Gorer P.A. Boyse — Pathological changes in F_1 hybrid mice following transplantation of spleen cells from donors of the parental strains. Immunology 2, 182, 1959

67. Gray J.G. Monaco,Wood — Studies on heterologous anti-lymphocyte serum in mice.I. In vitro and in vivo properties. J. Immunol. 96, 217, 1966

68. Gorer P.A. — Some reactions of H-2 antibodies in vitro and in vivo. Ann. N.Y. Acad. Sci. 73, 707, 1958

69. Ginsburg H. — Graft-versus-host reactions in tissue culture. I. Lysis of monolayers of embryo mouse cells from strains differing in H-2. Immunology 14, 621, 1968

70. Griscelli C. Vassalli — The distribution of large dividing lymph node cells in syngeneic recipient rats after intravenous injection. J. Exp. Med. 130, 1427, 1969

71. Huhn D. Rodt,Thierfelder — Immunhistochemische Untersuchungen an T-Lymphozyten der Maus. Blut XXVIII, 1, 1974

72. Hardin J. Chused — Suppressor cells in the graft-versus-host reaction. J. Immunol. 11, 650, 1973

73. Hardt F. Claesson — Graft-versus-host reactions mediated by spleen cells from amyloidotic and nonamyloidotic mice. Transpl. 12, 36, 1970

74. Haskova V. Gansova — Quantitative aspects of graft-versus-host reaction in popliteal lymph node. Fol. Biol. (Praha) 16, 314, 1970

75. Haskova V. Gansova — Regional lymph node weight increase by semisyngeneic cells and the possible role of a non-immunological recognition process in transplantation. Fol. Biol. (Praha) 18, 19, 1971

76. Hilgard H. — Synergism of thymus and bone marrow in the production of graft-versus-host splenomegaly in x-irradiated hosts. J. Exp. Med. 132, 317, 1970

77. Howard J.G. — Changes in the activity of the reticulo-endothelial system (res) following the injection of parental spleen cells into F_1 hybrid mice. Brit. J. Exp. Path. 42, 72, 1960

78. Howard J.G. — The use of reticuloendothelial function for studying graft-versus-host reaction in the presence of potential host-versus-graft reaction. J. Reticuloendothel. Soc. 1, 29, 1964

79. Huemer R.P. Keller,Lee — Thymidine incorporation in mixed cultures of spleen cells from mice of differing H-2 types. Transpl. 6, 706, 1968

80. Howe M. Berman,Cohen — Relationship between proliferative and effector phases of the mixed lymphocyte reaction and graft-versus-host reaction. J. Immunol. 111, 1243, 1973

81. John M. Carswell,Boyse — Production of theta antibody by mice that fail to reject theta incompatible skin grafts. Nature New Biol. 238, 57, 1972

82. Korcakova L. Holub,Haskova — Regional graft-versus-host and host-versus-graft reactions: Histology of the popliteal lymph nodes. Fol. Biol. (Praha) 28, 309, 1973

83. Klein J. Park — Gvh reaction across different regions of the H-2 complex of the mouse. J. Exp. Med. 137, 1213, 1973

84. Klein J. — Transplantation immunity to antigens of the H-1 and H-3 locus: strenght, the effect of dosage, the additive effect and the development of H-3 antigens. Fol. Biol. (Praha) 11, 169, 1965

85. Klein J. — Biology of the mouse histocompatibility-2 complex. Springer-Verlag 1975 a) S.9 b) S. 132 c) S. 151 d) S. 478

86. Levine S. — Local and regional forms of graft-versus-host disease in lymph nodes. Transpl. 6, 799, 1968

87. Longenecker B. Sheridan,Law — Measurement of graft-versus-host reactions on the chorioallantoic membrane of the chicken. Transpl. 9, 544, 1970

88. Lilliehöök B. Blomgren — Weak graft-versus-host response of CBA lymphocytes against the H-2 identical strain C_3H. Scand. J. Immunol. 3, 637, 1974

89. Lagunoff D. — The proliferative response in rat lymph node. Exp. Mol. Pathol. 10, 1, 1969

90. Lengerova A. Viklicky — Relative "strength" of histocompatibility barriers as compared on the basis of different criteria. Fol. Biol. (Praha) 15, 333, 1969

91. Lafferty K.J. Walker,Scollay — Allogeneic interactions provide evidence for a novel class of immunological reactivity. Transplant. Rev. 12, 198, 1972

92. Lafferty K.J. Jones — Reactions of graft-versus-host type. Austr. J. Exp.Biol.Med.Sci. 47, 17, 1969

93. Miller J. Mitchell — Thymus and antigen-reactive cells. Transplant. Rev. 1, 3, 1969

94. Monaco A.P. Wood,Gray — Studies on heterologous anti-lymphocyte serum in mice. II. Effect on the immune response. J. Immunol. 96, 229, 1966

95. MacLaurin B.P. — Thymus origin of lymphocytes reacting and stimulating reaction in mixed lymphocyte cultures - studies in the rat. Clin. Exp. Immunol. 10, 649, 1972

96. McGregor D. — Bone marrow origin of immunologically competent lymphocytes in the rat. J. Exp. Med. 127, 953, 1968

97. McDevitt H. Bechtol — Ir genes and antigen recognition. in: The immune system. Genes, Receptors,Signals. E.E.Sercarz, A.R. Williamson Academic Press, New York, p. 597, 1974

98. Marchesi V.T. Gowans — The migration of lymphocytes through the endothelium of venules in lymph nodes: an electron microscope study. Proc.Roy.Soc. B 159, 283, 1963

99. Miller J. Pierce — An assay of graft-host interaction across strong and weak histocompatibility barriers in mice. J. Exp. Med. 117, 863, 1963

100. Mitchell G.F. Miller — Cell to cell interaction in the immune response. II, The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes. J. Exp. Med. 128, 821, 1968

101. Monie H. Everett — The popliteal node assay for graft-versus-host interaction in mice. I. Location and proliferation of donor and host cells within the popliteal node. Anat. Rec. 179, 19, 1973

102. Monie H. — Radioautographic and marker chromosome analysis of the graft-versus-host reaction in the mouse popliteal node. Anat. Rec. 172, 368, 1972

103. Monie H. — Proliferation in the popliteal node of host short-lived lymphocytes following injection of parental cells into the F_1 footpad. Anat. Rec. 175, 391, 1973

104. Morse H. Asofsky — In vivo effects of antithymocyte serum on the homing patterns and graft-versus-host reactivity of murine splenic lymphocytes. Cell. Immunol. 11, 19, 1974

105. Nakic B. Kastelan — Quantitative analysis of the chimäric state in mice. II. Cytological examination of the proportion of proliferating donor and host cells in runt disease in mice. Immunology 12, 615, 1967

106. Nisbet N. Simonsen — Primary immune response in grafted cells. Dissociation between the proliferation of activity and the proliferation of cells. J. Exp. Med. 125, 967, 1967

107. Nowell P.C. Defendi — Distribution of proliferating donor cells in runt disease in rats. Transpl. 2, 375, 1964

108. Nowell P.C. Wilson — Studies on the life history of lymphocytes. I. The life-span of cells responsive in the mixed lymphocyte interaction. J. Exp. Med. 133, 1131, 1971

109. Nabholz M. Vives,Young — Cell mediated cell lysis in vitro: Genetic control of killer cell production and target specificities in the mouse. Europ. J. Immunol. 4, 378, 1974

110. Oppltva L. Demant — Genetic determinants for the gvh reaction in the H-2 complex. Transpl. Proc. 5, 1367, 1973

111. Perlman P. Holm — Cytotoxic effects of lymphoid cells in vitro. Adv. Immunol. 11, 117, 1969

112. Peck A.B. Click — Immune responses in vitro. VIII. Mixed leucocyte culture reactivity induced by theta antigen. Transpl. 16, 339, 1973

113. Peck A.B. Bach,Boyse — Cellular reactivities associated with theta-antigen disparity. Transplant. Proc. 5, 1611, 1973

114. Rosenau W. — Target cell destruction. Fed. Proc. 27, 34, 1968

115. Rodt H. Thierfelder Eulitz — Antilymphocytic antibodies and marrow transplantation. III. Effect of heterologous anti-brain antibodies on acute secondary disease in mice. Europ. J. Immunol. 4, 25, 1974

116. Rodt H. Thierfelder Eulitz — Antilymphocytic antibodies and marrow transplantation. IV. Comparison of the effects of antibody fragments directed against immunoglobulin or lymphocyte antigens on acute secondary disease. Exp. Hemat. 2, 195, 1974

117. Rodt H. Thierfelder Eulitz — Suppression of acute secondary disease by heterologous anti-brain serum. Blut 25, 385, 1972

118. Rößler R. Thierfelder — Unterdrückung der Wirt-gegen-Transplantat Reaktion gemessen im Lymphknotentest. Blut 31, 149, 1975

119. Russell P.S. — The weight gain assay for runt disease in mice. Ann. N.Y. Acad. Sci. 87, 445, 1960

120. Rupp J.C. Moore — Stimulation of the reticuloendothelial system in the rabbit by Freund's adjuvant. Arch. Path. 70, 43, 1960

121. Ruddle N.H. Waksman — Cytotoxicity mediated by soluble antigen and lymphocytes in delayed hypersensitivity. IV. Analysis of mechanism. J. Exp. Med. 128, 1267, 1968

122. Ramseier H. — Quantitative studies on antigenic recognition. I. Immunological and non-immunological parameters of the response. J. Exp. Med. 130, 1279, 1969

123. Rajewsky K. Pohlit — Specificity of helper function. Progr. Immunol. 1, 337, 1971

124. Reif A.E. Allen — The AKR thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissues. J. Exp. Med. 120, 413, 1964

125. Sankowski A. Nouza — The dynamics of graft-versus-host reaction across a strong and weak histcompatibility barrier. Fol. Biol. (Praha) 14, 372, 1968

126. Streilein J. Billingham — An analysis of graft-versus-host disease in syrian hamsters. I. The epidermolytic syndrome: Description and studies on its procurement. J. Exp. Med. 131, 163, 1970

127. Streilein J. Billingham — An analysis of graft-versus-host disease in syrian hamsters. II. The epidermolytic syndrome: Studies on its pathogenesis. J. Exp. Med. 131, 181, 1970

128. Schlesinger M. Shlomai — Antigenic differences between spleen-seeking and lymph node-seeking thymus cells. Europ. J. Immunol. 3, 335, 1973

129. Schoefl G.I. — The migration of lymphocytes across the vascular endothelium in lymphoid tissue. J. Exp. Med. 136, 568, 1972

130. Mage M.G. McHugh — Retention of graft-versus-host activity in non-adherent spleen cells after depletion of cytotoxic activity by incubation on allogeneic target cells. J. Immunol. 111, 652, 1973

131. Simonsen M. Engelbreth-Holm, Jensen — A study of the graft-versus-host reaction in transplantation to embryos, F_1 hybrids and irradiated animals. Ann. N.Y. Acad. Sci. 73, 834, 1958

132. Simonsen M. — Graft-versus-host reactions. Their natural history and applicability as tools of research. Progr. Allergy 6, 349, 1962

133. Simonsen M. — Biological incompatibility in kidney transplantation in dogs. Acta Path. Microbiol. Scand. 32, 36, 1953

134. Simonsen M. — The impact on the developing embryo and newborn animal of adult homologous cells. Acta Path. Microbiol. Scand. 40, 480, 1957

135. Singh J. Sabbadini — Nonspecific cytotoxicity in graft-versus-host reactions. Transpl. 11, 475, 1971

136. Sprent J. Miller — Antigen-induced selective recruitment of circulating lymphocytes. Cell. Immunol. 2, 171, 1971

137. Thierfelder S. — Experimental bone marrow transplantation. Blut 1, 30, 1975

138. Taub R.N. Krantz — The effect of localized injection of adjuvant material on the draining lymph node. I. Histology. Immunology 18, 171, 1970

139. Thursh D. Emeson — The immunologically specific retention of recirculating long-lived lymphocytes in lymph nodes stimulated by xenogeneic erythrocytes. J. Exp. Med. 135, 754, 1972

140. Twist V.W. Barnes — Popliteal lymph node weight gain assay for graft-versus-host reactivity in mice. Transpl. 15, 182, 1972

141. Turk J.L. Willoughby — Central and peripheral effects of anti-lymphocyte sera. Lancet I, 249, 1967

142. Taub R.N. Lance — Histopathological effects in mice of heterologous antilymphocyte serum. J. Exp. Med. 128, 1281, 1968

143. Thierfelder S. Möller, Kimura Dörmer, Eulitz — Die Zellspezifität heterologer, sogenannter antilymphozytärer Antiseren vom Kaninchen. Zeitschr. d. ges. exp. Med. 147, 44, 1968

144. Thierfelder S. Rodriguez-Paradisi — Cytology and histology of haemopoietic cell transplantation under the influence of ALS in mice. II. The effect of marrow from donors pretreated with ALS on the recipient. Clin. Exp. Imm. 8, 121, 1971

145. Thierfelder S. Mempel — Knochenmarkstransplantation und Antilymphozytenserum. Hämatologie und Bluttransfusion 8, 198, 1969

146. Taub R.N. Lance — Effects of heterologous anti-lymphocyte serum on the distribution of ^{51}Cr-labelled lymph node cells in mice. Immunology 15, 633, 1968

147. Volkman A. Collins — The restorative effect of peritoneal macrophages on delayed hypersensitivity following ionizing radiation. Cell. Immunol. 2, 552, 1971

148. Volkman A. — The host cell response in the local graft-versus-host reaction induced in the kidneys of F_1 rats by parental thoracic duct lymphocytes. J. Exp. Med. 136, 21, 1972

149. Weiser R.S. Granger,Brown — Production of acute allogeneic disease in mice. Transpl. 3, 10, 1965

150. Werdelin O. Foley,Rose — The growth of the cell population in the draining popliteal lymph node of rats injected with rat adrenal in Freund's adjuvant. Immunology 21, 1059, 1971

151. Wheeler H. Corson,Coyne — Use of spleen-slice homografts in the study of graft-versus-host reactions. Nature 197, 712, 1963

152. Wilson D. — Quantitative studies on the behaviour of sensitized lymphocytes in vitro. I. Relationship of the degree of destruction of homologous target cells to the number of lymphocytes and to the time of contact in culture and consideration of the effect of isoimmunserum. J. Exp. Med 122, 143, 1965

153. Yoshida Y. Osmond — Graft-versus-host activity of rat bone marrow, marrow fractions and lymphoid tissues quantitated by a popliteal lymph node weight assay. Transpl. 12, 121, 1971

154. Yu H. Gordon — Helper function in antibody synthesis mediated by soluble factors. Nature New Biol. 244, 20, 1973

155. Yoffey J.M. Drinker — The cell content of peripheral lymph and its bearing on the problem of the circulation of the lymphocyte. Anat. Rec. 73, 417, 1939

156. Biberfeld P. Holm, Perlman — Inhibition of lymphocyte peripolesis and cytotoxic action in vitro by antilymphocyte serum (ALS). Exp. Cell Res. 54, 136, 1968

157. Holm G. — The in vitro cytotoxicity of human lymphocytes: The effect of metabolic inhibitors. Exp. Cell Res. 48, 334, 1967

158. Lundgren G. Zukoski — Differential effects of human granulocytes and lymphocytes on human fibroblasts in vitro. Clin. Exp. Immunol. 3, 817, 1968

159. Lundgren G. — Induction and suppression of the cytotoxic activity of human lymphocytes in vitro by heterologous antilymphocyte serum. Clin. Exp. Immunol. 5, 381, 1969

160. Perlman P. Nilsson — Inhibition of cytotoxicity of lymphocytes by concanavalin A in vitro. Science 168, 1112, 1968

Lebenslauf

27.4.1951	geboren als Sohn von Gerhard König und seiner Gemahlin Hildegard König, geb. Richter, in Leipzig
1957 - 61	Besuch der Schwanthaler-Volksschule in München
1961 - 70	Theresiengymnasium in München
1970	Reifeprüfung in München
1970 - 76	Studium der Medizin an der Universität München
6.4.1973	Ärztliche Vorprüfung
8.3.1974	Eheschließung mit Frl. Brigitte Krieg
1.9.1976	Staatsexamen
15.12.76 - 31.5.77	Interne Medizinalassistentenzeit am Elisabeth-Krankenhaus in Straubing sowie am Städt. Krankenhaus Harlaching in München
1.6.77 - 15.12.77	Chirurgische Medizinalassistentenzeit an der Rinecker-Klinik in München
1.1.1978	Dienstantritt in der Fürst-Wrede-Kaserne in München